

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios



**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO
FOTOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS FITOSANITARIOS EN MATRICES
MEDIOAMBIENTALES Y AGROALIMENTARIAS
MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE
EXTRACCIÓN Y MICROEXTRACCIÓN**

María Fernández Álvarez

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

Santiago de Compostela, Junio 2009

Dña. María Llompart Vizoso y **Dña. Marta Lores Aguín**, Profesoras Titulares del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, y **D. Thierry Dagnac**, Investigador del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia,

Autorizan:

A la Licenciada **Dña. María Fernández Álvarez** a la presentación del trabajo titulado **“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO FOTOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FITOSANITARIOS EN MATRICES MEDIOAMBIENTALES Y AGROALIMENTARIAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE EXTRACCIÓN Y MICROEXTRACCIÓN”** que ha realizado bajo nuestra dirección, para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela, a día 11 de Junio de 2009.

Dña. María Llompart Vizoso

Dña. Marta Lores Aguín

D. Thierry Dagnac

Agradecimientos

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, Marta Lores, María Llompart y Thierry Dagnac. Agradecerles su apoyo, la formación recibida y el brindarme la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias también a Carmen Jares por la ayuda prestada durante todos estos años.

Gracias al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, al Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios (IIAA) y, en especial, a Rafael Cela por acogerme en su grupo de investigación y permitirme la realización de este trabajo.

Gracias también a la Xunta de Galicia y al Ministerio de Ciencia e Innovación por las becas disfrutadas durante la realización de esta Tesis.

A Josep M. Bayona y a toda la gente del IQAB en el CSIC de Barcelona por su acogida y ayuda durante mi estancia. Moltes gràcies.

Al profesor Waldemar Wardencki, por aceptarme en su grupo de investigación durante los tres meses que pasé en la Facultad de Química de la Universidad Politécnica de Gdansk. Dziękuję bardzo.

A Pablo, no sólo porque ha trabajado duramente para que una parte importante de este trabajo fuese posible, sino también por su compañía y apoyo incondicionales. Gracias por todo, también por las discusiones patrón interno-surrogado que ya empiezo a echar de menos.

A Lucía, por ayudarme tantísimo y siempre con una sonrisa en la cara, y también por los sustos mañaneros que le añaden emoción al día a día. A Jorge, porque ha sido un apoyo muy importante todos estos años, por estar siempre dispuesto a echarme una mano, y porque es rara la vez que no me ha hecho reír. A Noe por su compañía y a Pili por sacarme de tantos apuros.

♪ No hace tanto del verano, pero ya vemos las primeras hojas caer; otra vez como cada año, como un círculo girando una y otra vez... ♪ gracias también a Rosa por animarme en mis "Días fríos", y a Carmen por sus sabios consejos y por los momentos "gachufáin".

Y gracias a toda la gente del IIAA en general porque, sin su presencia, estos años no hubieran sido lo mismo. Gracias por haberme prestado ayuda siempre que lo he necesitado, por llamarme cuando salía mi canción en la radio, por preguntar siempre ¿vas a hacer PLE?, por esas llamadas infructíferas para la voz misteriosa, por las tertulias musicales, por apoyarme en la cruzada anti-aire acondicionado, y por ese guión de "Cámara Gecé" que se quedó en proyecto pero que dejaré para el recuerdo alguna que otra frase memorable.

Gracias Rocío y Ramón, por vuestra amistad y por las noches de "Lembranzas" que han convertido al jueves en un día tan especial. Ojalá esos planes de futuro de los que siempre hablamos se cumplan y, si no, siempre podremos montar una destilería en Coruña...

Gracias Bea y Uxía. Casi sin darnos cuenta llevamos siendo amigas más de la mitad de nuestras vidas y estoy convencida de que así seguirá siendo. Este trabajo también os lo debo a vosotras, ya que salir, viajar, conciertear y, en definitiva, pasar momentos juntas me permite cargar las pilas para seguir adelante. Gracias niñas!

Gracias Paula y Miguel. Estos años que hemos estado más lejos los unos de los otros me he dado cuenta de lo mucho que os necesito y de lo mucho que disfruto cuando estamos juntos. Gracias manitos, porque sé que siempre puedo contar con vosotros para lo que sea. Y, finalmente, gracias a mis padres, porque sin vuestro cariño, apoyo y sacrificio diarios yo nunca hubiera llegado hasta aquí. No os lo digo nunca, pero os quiero un montón!



♪ Questions unfolding like
books and their pages
They just keep on turning for me
And I keep on asking,
Why every question will somehow relate back to me
I was told by a knight of the sun,
That wisdom could set people free
Be content in your questions
And may I just mention
You're only a drop in the sea
Direction revolving
These questions I'm solving but nobody hears what I say
My answers unspoken of sweetest emotion,
Believe how I feel today
Just believe how you feel today ♪

(K.S.)

A mis padres y hermanos

ÍNDICE

ABSTRACT	1
I. INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I.1. PESTICIDAS	7
1.1 INTRODUCCIÓN	7
1.2 CLASIFICACIÓN	8
1.3 EVOLUCIÓN Y DESARROLLO DEL MERCADO DE PESTICIDAS	10
1.4 RESTRICCIONES EN EL USO DE PESTICIDAS. LEGISLACIÓN	11
1.5 PESTICIDAS PIRETROIDES	16
1.5.1 INTRODUCCIÓN	16
1.5.2 ESTRUCTURA	17
1.5.3 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	19
1.5.4 USOS	20
1.5.5 TOXICIDAD	23
1.5.5.1 Modo de acción	23
1.5.5.2 Relación entre estereoquímica y toxicidad	24
1.5.5.3 Toxicidad aguda en mamíferos	24
1.5.5.4 Toxicidad crónica y subcrónica	25
1.5.5.5 Mutagenicidad y carcinogenicidad	25
1.5.5.6 Disrupción endocrina	25
1.5.5.7 Exposición humana	26
1.5.5.8 Efectos en otros organismos no-objetivo	26
1.5.6 DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE	27
1.5.6.1 Liberación al medioambiente	27
1.5.6.2 Transporte y reparto	28
1.5.6.3 Transformación y degradación	28
1.5.6.4 Niveles en el medioambiente	29
1.5.7 BUTÓXIDO DE PIPERONILO (PBO)	29
1.6 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS	31
1.6.1 INTRODUCCIÓN	31
1.6.2 ESTRUCTURA	32
1.6.3 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	36
1.6.4 USOS	37
1.6.5 TOXICIDAD	38

1.6.6 DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE.....	39
1.7 OTROS PESTICIDAS.....	41
1.7.1 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS	41
1.7.2 HERBICIDAS AMIDA	43
BIBLIOGRAFÍA	45
 CAPÍTULO I.2. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).....	 51
2.1 INTRODUCCIÓN.....	51
2.2 PRINCIPIOS BÁSICOS DE SPME.....	52
2.3 DISPOSITIVO UTILIZADO.....	53
2.4 DESARROLLO DEL MÉTODO.....	53
2.5 PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA EFICACIA DE LA EXTRACCIÓN .	55
2.5.1 FASE EXTRACTANTE: RECUBRIMIENTO	55
2.5.2 TIEMPO DE EXTRACCIÓN	56
2.5.3 TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN	56
2.5.4 EFECTO SALINO.....	57
2.5.5 MODIFICACIÓN DEL PH	57
2.5.6 ADICIÓN DE DISOLVENTE	57
2.5.7 AGITACIÓN DE LA MUESTRA Y FORMA DEL VIAL.....	58
2.5.8 VOLUMEN DE MUESTRA Y DEL ESPACIO DE CABEZA	58
2.6 APLICACIONES DE LA SPME AL ANÁLISIS DE PESTICIDAS	59
2.6.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA.....	59
2.6.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUELO	59
2.6.3 ANÁLISIS DE ALIMENTOS	60
2.6.4 ANÁLISIS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS	61
BIBLIOGRAFÍA	61
 CAPÍTULO I.3. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD) .	 67
3.1 INTRODUCCIÓN.....	67
3.2 ETAPAS DE LA DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA	68
3.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MSPD	71
3.3.1 AGENTE DISPERSANTE	71
3.3.2 DISOLVENTE DE ELUCIÓN.....	72
3.3.3 MODIFICACIÓN DE LA MATRIZ	73

3.3.4 TEMPERATURA Y PRESIÓN	73
3.4 ETAPAS DE LIMPIEZA.....	74
3.5 MINIATURIZACIÓN	75
3.6 APLICACIONES DE LA MSPD AL ANÁLISIS DE PESTICIDAS	75
3.6.1 ANÁLISIS DE FRUTAS, VERDURAS, CEREALES Y DE OTRAS MATRICES VEGETALES	75
3.6.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE TEJIDOS Y GRASAS DE ORIGEN ANIMAL..	76
3.6.3 ANÁLISIS DE OTRAS MATRICES ALIMENTARIAS DE ORIGEN ANIMAL ...	76
3.6.4 ANÁLISIS DE OTRAS MUESTRAS.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	77
 CAPÍTULO I.4. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS	
(PSE).....	85
4.1 INTRODUCCIÓN	85
4.2 FUNDAMENTO TEÓRICO	85
4.2.1 PROCESOS DURANTE LA EXTRACCIÓN	86
4.2.2 CONSIDERACIONES FÍSICO-QUÍMICAS QUE JUSTIFICAN LA MEJORA DE LAS EXTRACCIONES A TEMPERATURAS Y PRESIONES ELEVADAS.....	86
4.3 INSTRUMENTACIÓN	88
4.4 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	88
4.5 PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA EFICACIA DEL PROCESO.....	91
4.5.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	91
4.5.2 PRESIÓN	91
4.5.3 DISOLVENTE	92
4.5.4 NÚMERO DE CICLOS	93
4.5.5 TIEMPO DE EXTRACCIÓN.....	93
4.6 ETAPAS DE LIMPIEZA.....	93
4.7 APLICACIONES DE LA PSE AL ANÁLISIS DE PESTICIDAS	94
4.7.1 ANÁLISIS DE SUELOS, SEDIMENTOS Y LODOS.....	95
4.7.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y ALIMENTARIAS	95
BIBLIOGRAFÍA.....	96
 CAPÍTULO I.5. FOTODEGRADACIÓN.....	103
5.1 INTRODUCCIÓN	103

5.2 FOTODEGRADACIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE	103
5.3 APLICACIONES TÉCNICAS DE LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN	105
5.4 CINÉTICA DE LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN.....	105
5.5 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO FOTOQUÍMICO DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS	106
5.6 FOTO-SPME.....	108
5.7 FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES	109
5.7.1 INTRODUCCIÓN	110
5.7.2 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA ALETRINA.....	111
5.7.3 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA CIFLUTRINA	114
5.7.4 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA CIHALOTRINA	115
5.7.5 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA CIPERMETRINA	117
5.7.6 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA DELTAMETRINA.....	120
5.7.7 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DEL FENVALERATO	124
5.7.8 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DEL FLUCITRINATO	127
5.7.9 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA PERMETRINA	129
5.7.10 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA FENOTRINA	131
5.7.11 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA TRANSFLUTRINA	132
5.8 FOTODEGRADACIÓN DEL BUTÓXIDO DE PIPERONILO	133
BIBLIOGRAFÍA	136
 II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	 143
BIBLIOGRAFÍA	148
 III. EXPERIMENTAL	 149
1. PATRONES.....	151
2. REACTIVOS, GASES Y DISOLVENTES	153
3. MATERIAL.....	154

4. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO	156
4.1 CAPÍTULOS IV.1, IV.2 Y IV.3 (DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN SUELO, PIENSO Y LECHE).....	156
4.2 CAPÍTULO IV.4 (FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES)	156
5. ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DEL MATERIAL	157
5.1 LIMPIEZA DEL MATERIAL.....	157
5.2 ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DE FIBRAS DE SPME.....	158
5.3 ACONDICIONAMIENTO DE REACTIVOS	159
6. GESTIÓN DE RESIDUOS	159
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 161
CAPÍTULO IV.1. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN SUELO	165
1.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	166
1.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS	166
1.1.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. SPME	167
1.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES.....	168
1.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	170
1.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	170
1.2.2 EXPERIMENTOS PREVIOS DE SPME	171
1.2.2.1 Influencia del incremento de la temperatura de extracción y de la adición de disolvente	171
1.2.2.2 Selección de fibras	173
1.2.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SPME: DISEÑO FACTORIAL.....	175
1.2.3.1 Cartas Pareto y gráficos de efectos principales.....	176
1.2.3.2 Gráficos de interacciones	179
1.2.4 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO	182
1.2.5 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD	184
1.2.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUELO REALES	187
BIBLIOGRAFÍA.....	190

CAPÍTULO IV.2. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN PIENSO	193
2.1 PARTE EXPERIMENTAL	194
2.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS.....	194
2.1.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. MSPD	195
2.1.3 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. PSE.....	197
2.1.4 PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA BASADOS EN LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)	198
2.1.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES	199
2.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: MSPD.....	201
2.2.1 EXPERIMENTOS PREVIOS DE MSPD	201
2.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MSPD: DISEÑO FACTORIAL.....	202
2.2.3 INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE MUESTRA	210
2.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS	211
2.2.5 CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS	211
2.2.6 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO	212
2.2.7 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD.....	214
2.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PSE.....	218
2.3.1 EXPERIMENTOS PREVIOS DE PSE.....	218
2.3.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PSE: DISEÑO FACTORIAL.....	220
2.3.2.1 Cartas Pareto y gráficos de efectos principales	222
2.3.2.2 Gráficos de interacciones.....	225
2.3.3 INFLUENCIA DEL NÚMERO Y TIPO DE FILTROS	228
2.3.4 CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS	228
2.3.5 PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS	229
2.3.6 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO	231
2.3.7 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD.....	234
2.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PIENSO REALES	236
BIBLIOGRAFÍA	240
 CAPÍTULO IV.3. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN LECHE.....	 243
3.1 PARTE EXPERIMENTAL	244
3.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS.....	244
3.1.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. SPME	245

3.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES.....	246
3.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	247
3.2.1 EXPERIMENTOS PREVIOS DE SPME	247
3.2.1.1 Influencia del modo de muestreo y de la relación de dilución	247
3.2.1.2 Influencia del volumen de acetona	249
3.2.1.3 Influencia del tiempo de extracción	250
3.2.1.4 Influencia del recubrimiento de la fibra	251
3.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SPME: DISEÑO FACTORIAL.....	253
3.2.2.1 Cartas Pareto y gráficos de efectos principales.....	254
3.2.2.2 Gráficos de interacciones	257
3.2.3 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO	261
3.2.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE CON DIFERENTE CONTENIDO GRASO	264
3.2.5 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD	265
3.2.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE REALES	267
BIBLIOGRAFÍA.....	268
 CAPÍTULO IV.4. ESTUDIO DE LA FOTODEGRADACIÓN DE INSECTICIDAS PIRETROIDES.....	 271
4.1 PARTE EXPERIMENTAL	272
4.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS	272
4.1.2 SPME Y PROCEDIMIENTOS DE FOTODEGRADACIÓN	272
4.1.2 TEST DE OSCURIDAD.....	274
4.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES.....	275
4.1.4 MEDIDA DE ESPECTROS UV-VIS.....	277
4.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PIRETROIDES DIHALOGENOVINÍLICOS.....	277
4.2.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES.....	279
4.2.1.1 Espectros UV	279
4.2.1.2 Test de oscuridad.....	279
4.2.2 FOTO-SPME	281
4.2.2.1 Influencia del tiempo de irradiación	281

4.2.2.2 Comportamiento cinético de primer orden	282
4.2.3 ESTUDIO CINÉTICO UTILIZANDO UNA MUESTRA DE AGUA REAL	284
4.2.4 IDENTIFICACIÓN DE FOTOPRODUCTOS	285
4.2.3.1 Fotodegradación de la λ -cihalotrina	294
4.2.3.2 Fotodegradación de la permetrina.....	296
4.2.3.3 Fotodegradación de la ciflutrina.....	299
4.2.3.4 Fotodegradación de la cipermetrina	302
4.2.3.5 Fotodegradación de la deltametrina	304
4.2.4 FOTO-SPME UTILIZANDO LUZ SOLAR NATURAL	305
4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PIRETROIDES DE USO DOMÉSTICO Y BUTÓXIDO DE PIPERONILO.....	307
4.3.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	308
4.3.1.1 Espectros UV	308
4.3.1.2 Test de oscuridad	309
4.3.2 FOTO-SPME.....	310
4.3.2.1 Influencia del tiempo de irradiación	310
4.3.2.2 Comportamiento cinético de primer orden	311
4.3.3 IDENTIFICACIÓN DE FOTOPRODUCTOS	313
4.3.3.1 Fotoproductos de la empenetrina	322
4.3.3.2 Fotoproductos de la transflutrina	323
4.3.3.3 Fotoproductos de la aletrina.....	326
4.3.3.4 Fotoproductos de la fenotrina.....	327
4.3.3.5 Fotoproductos de la cifenotrina	329
4.3.3.6 Fotoproductos del PBO	331
4.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PIRETROIDES CARENTES DE ANILLO CICLOPROPANO.....	332
4.4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	333
4.4.1.1 Espectros UV	333
4.4.1.2 Influencia de la fuente de irradiación	334
4.4.1.3 Test de oscuridad	336
4.4.2 FOTO-SPME.....	336
4.4.2.1 Influencia del tiempo de irradiación	336
4.4.2.2 Comportamiento cinético de primer orden	338
4.4.3 IDENTIFICACIÓN DE FOTOPRODUCTOS	340

4.4.3.1 Decarboxilación y rutas relacionadas	352
4.4.3.2 Fotoproductos asociados con la parte ácida	354
4.4.3.3 Fotoproductos asociados con la parte alcohol.....	355
4.5 TOXICIDAD DE LOS FOTOPRODUCTOS	356
BIBLIOGRAFÍA.....	358
 V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	 363
 ANEXO I: ESTANCIAS	 377
ANEXO I.1. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AIRE <i>INDOOR</i> DE EDIFICIOS MODERNOS CON CASOS DETECTADOS DE LIPOATROFIA SEMICIRCULAR	381
BIBLIOGRAFÍA.....	383
 ANEXO I.2. FOTO-SPME DE CONTAMINANTES <i>INDOOR</i>	 385
 ANEXO I.3. ESTUDIO DE LA FOTOOXIDACIÓN DEL ACEITE MEDIANTE SPME	 411
BIBLIOGRAFÍA.....	413
 ANEXO II: LISTADO DE PUBLICACIONES.....	 423
 ANEXO III: ACRÓNIMOS.....	 427

ABSTRACT

The widespread use of **pesticides** in agriculture, as well as the toxicity and the environmental behaviour of these compounds, may result in negative consequences for both the human and other living creatures and environment in general. Therefore, the impact derived from the use of pesticides in the agricultural activities and in the final products is a subject of major concern. In this sense, **the first goal** of this work has been the development of new analytical methods based on the most advanced **extraction techniques** followed by GC- μ ECD and GC-MS analysis, for the determination of a large number of pesticides of several families including organochlorines, pyrethroids, organophosphorus and chloroacetanilides in environmental and agro-food samples such as **soil, cattle feed and bovine milk**, all of them of a great complexity. These extraction procedures were based on **SPME, PSE and MSPD**. In most cases the extract clean-up was integrated in the extraction process without the need of any additional steps. These novel methods represent some clear advantages such as a significant reduction in the cost of the analyses regarding both the required time and the organic solvent consumption. It must be also pointed out the small sample size that has been handled in all cases: soil (0,5 g), cattle feed (1 g) and milk (1 mL). Due to the low generation of residues, the proposed methodologies can be described as **environmentally friendly**. To the best of our knowledge, this is the first time that these techniques have been applied to the extraction of pyrethroids from these complex matrices. **Chemometric tools** have been employed in order to optimise the variables affecting the extraction processes. In this manner, by using experimental designs, the most influential factors in each extraction process have been found, the influence of interactions between factors has been evaluated, and the optimal conditions have been determined minimizing the required number of experiments. The developed methods were applied to the analysis of different samples collected in dairy cattle farms from Galicia (NW Spain) as part of an integrated study that intended to know the **global impact** of the use of pesticides in the **Galician farms**, as well as their repercussion in the **final quality of the milk**. The proposed methodologies have allowed the pesticide quantification at concentration levels **bellow the legal limits** established by Spanish and European legislation.

The **second goal** of this work has been the study of the **photodegradation of pyrethroids**. This group of compounds was selected considering the relative low information about their photodegradation we could found in the literature. In fact, for

some of the target compounds such as cyphenothrin and empenothrin, no previous published studies were found. As it is well known, the **degradation by the action of light** is one of the most important processes which determine the environmental fate of pesticides. Thus, the photochemical behaviour of **twelve pyrethroids** and one **synergist** has been studied by **photo-SPME**. This analytical tool, recently developed in our laboratory, is based on irradiation of the SPME fiber after the extraction of the analytes permitting the simultaneous analysis of both primary compounds and photoproducts. In this manner, by means of rapid and simple experiments, photodegradation **kinetic curves** of the target compounds have been described, **kinetic parameters** have been estimated and a large number of **photoproducts** have been identified, some of which have been proposed for the first time in the present work.

I. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I.1. PESTICIDAS

1.1 INTRODUCCIÓN

Un **pesticida** es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, natural o sintética, elaborada para controlar, matar, repeler o mitigar cualquier **plaga**. Dicha plaga puede ser cualquier organismo vivo que cause daños a cultivos, seres humanos u otros animales, provocando pérdidas económicas y/o la transmisión de enfermedades. Las plagas pueden ser de:

- insectos,
- ratones y otros animales,
- plantas no deseadas (malas hierbas),
- hongos,
- microorganismos (bacterias, virus), o
- priones. [1]

Desde los inicios de la **agricultura**, los seres humanos han utilizado sustancias químicas para el control de plagas. Inicialmente se utilizaban compuestos inorgánicos como azufre, arsénico, mercurio o plomo; pero el descubrimiento por parte de Paul Müller, en 1939, del insecticida **DDT** causó un gran impacto en el control de plagas y pronto se extendió su uso por todo el mundo. Por aquel entonces, los pesticidas gozaban de una buena reputación, principalmente debido al control que ejercían sobre enfermedades como la malaria (transmitida por mosquitos) y la peste bubónica (transmitida por pulgas), ambas responsables de la muerte de millones de personas. Sin embargo, esta opinión cambió radicalmente después de que se conocieran los efectos tóxicos del DDT en pájaros, particularmente tras la publicación del libro ***Silent Spring*** (Primavera Silenciosa) por **Rachel Carson** (Figura I.1.1), en 1962. Actualmente, debido a los posibles efectos tóxicos de los



Figura I.1.1 Rachel Carson, autora del libro *Silent Spring*.

pesticidas sobre la salud humana y el medioambiente, existen **regulaciones** estrictas relativas a su registro y uso por todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. No obstante y, a pesar de los avances en lo que respecta al control biológico de las plagas y al desarrollo de la resistencia de las plantas a las mismas (**agricultura ecológica**), los pesticidas son todavía indispensables para alimentar y proteger de enfermedades a la población mundial. Es más, se ha estimado que, si no se aplicaran pesticidas, se podría perder aproximadamente un tercio de las cosechas. [2]

1.2 CLASIFICACIÓN

Los pesticidas se pueden **clasificar** atendiendo a diferentes criterios: organismo objetivo, constitución química, toxicidad, modo de acción, etc. En función del **tipo de organismo** que el pesticida *desea* controlar se distinguen, entre otros, los siguientes grupos [1]:

- fungicidas: matan hongos (incluyendo añublos, moho, royas, etc.),
- herbicidas: matan malas hierbas y otras plantas no deseadas,
- insecticidas: matan insectos y otros artrópodos,
- acaricidas: matan ácaros que se alimentan en plantas y animales,
- moluscicidas: matan caracoles y babosas,
- nematocidas: matan nematodos (organismos microscópicos similares a los gusanos que se alimentan en las raíces de las plantas),
- ovicidas: matan huevos de insectos y ácaros,
- feromonas: compuestos bioquímicos que interrumpen el apareamiento de los insectos,
- rodenticidas: controlan a los ratones y a otros roedores.

Los **herbicidas**, **insecticidas** y **fungicidas** son los pesticidas más habituales y, sobre la base de su **constitución química**, se diferencian los siguientes subgrupos [2]:

herbicidas:

- **amidas**
- ácidos benzoicos
- carbamatos
- nitrilos
- nitroanilinas
- organofosforados
- fenoxi ácidos
- piridinas y compuestos de amonio cuaternarios
- piridacinas y piridacinonas
- triazinas
- ureas

insecticidas:

- benzoilureas
- carbamatos
- **organoclorados**
- **organofosforados**
- **piretroides**

fungicidas:

- azoles
- bencimidazoles
- ditiocarbamatos
- morfolinas
- misceláneo

En la Tabla I.1.1 se han incluido los nombres comunes de los pesticidas (y algunos productos de su degradación) estudiados en el presente trabajo, además de la clasificación correspondiente en función de su uso y de su constitución química.

Tabla I.1.1 Clasificación de los pesticidas estudiados en el presente trabajo.

Clase química	Pesticida	Uso
Piretroides	Aletrina	Insecticida
	Cifenotrina	Insecticida
	Ciflutrina	Insecticida
	λ -Cihalotrina	Insecticida
	Cipermetrina	Acaricida/Insecticida
	Deltametrina	Insecticida
	Empentrina	Insecticida
	Fenotrina	Insecticida
	Fenvalerato	Acaricida/Insecticida
	Flucitrinato	Acaricida/Insecticida
	Permetrina	Acaricida/Insecticida
	Teflutrina	Insecticida
	Tetrametrina	Insecticida
	Transflutrina	Insecticida
Organoclorados	Aldehído de endrina	Producto de degradación/metabolito
	Aldrina	Insecticida
	Cetona de endrina	Producto de degradación/metabolito
	α -Clordano	Insecticida
	γ -Clordano	Insecticida
	4,4'-DDD	Insecticida
	4,4'-DDE	Producto de degradación/metabolito
	4,4'-DDT	Acaricida/Insecticida
	Dieldrina	Insecticida
	Endosulfán I	Acaricida/Insecticida
	Endosulfán II	Acaricida/Insecticida
	Endrina	Insecticida
	Epóxido de heptacloro	Producto de degradación/metabolito
	Heptacloro	Insecticida
	α -Lindano	Acaricida/Insecticida/Rodenticida
	β -Lindano	Acaricida/Insecticida/Rodenticida
	γ -Lindano	Acaricida/Insecticida/Rodenticida
	δ -Lindano	Acaricida/Insecticida/Rodenticida
Organofosforados	Metoxicloro	Insecticida
	Sulfato de endosulfán	Producto de degradación/metabolito
	Clorpirifos	Acaricida/Insecticida/Nematicida
Amidas	Fenitroton	Acaricida/Insecticida
	Acetocloro	Herbicida
	Alacloro	Herbicida

1.3 EVOLUCIÓN Y DESARROLLO DEL MERCADO DE PESTICIDAS

El uso de pesticidas se ha visto incrementado en 50 veces desde 1950 y, hoy en día, se utilizan unos **2,5 millones de toneladas** de pesticidas industriales al año. La Figura I.1.2 muestra la evolución de las ventas desde 1990 hasta el 2005. De acuerdo con el Informe Anual del 2001-2002 de la Asociación para la Protección del Cultivo en Europa (**ECPA**), las principales áreas agrícolas en el uso de pesticidas son **Norte América, Europa y Asia** con un 31,9%, 23,8% y 22,6%, respectivamente, en 2001.

Además, los herbicidas son el principal grupo de pesticidas utilizado en el mundo, seguidos de los insecticidas y de los fungicidas. No obstante, se debe tener en cuenta que la cantidad de pesticidas aplicada en una determinada área geográfica depende de las condiciones climáticas y del brote de plagas y enfermedades de cada año en particular. [3, 4]

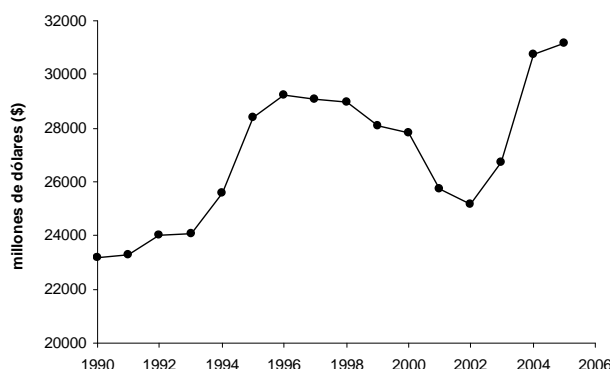


Figura 1.1.2 Evolución del mercado mundial de pesticidas desde 1990 hasta el 2005 [3].

1.4 RESTRICCIONES EN EL USO DE PESTICIDAS. LEGISLACIÓN

El **registro** de un pesticida concreto para su aplicación sobre un determinado cultivo demanda una serie de datos que prueben su **eficacia** y **seguridad** en el uso. Por eso, normalmente se requiere **información** acerca de sus propiedades físico-químicas, métodos analíticos, eficacia, toxicología, ecotoxicología, y destino y comportamiento en el medioambiente. Además, en los países desarrollados se han restringido los **residuos** remanentes en los cultivos tras la aplicación de los pesticidas para así garantizar un consumo alimentario seguro. Para ello, se han establecido niveles de residuo máximos (**MRLs**) en diferentes alimentos conforme a las buenas prácticas agrícolas, los efectos tóxicos observados para el pesticida en cuestión, y la cantidad de alimento consumido. Los MRLs normalmente se fijan teniendo en cuenta además el consumo diario admisible (ADI) de los pesticidas, que es la cantidad de pesticida que se puede ingerir diariamente durante toda la vida sin mostrar un efecto adverso apreciable [2]. Los MRLs están propuestos por la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Pesticidas (**JMPR**) [5] y recomendados por el Comité del Codex sobre Residuos de Pesticidas (**Codex Committee on Pesticide Residues**) [6].

Además, existe una **legislación comunitaria europea** específica en relación con los residuos de medicamentos veterinarios y de determinados plaguicidas y contaminantes en los alimentos de origen animal. La **Directiva 96/23/CE** dispone las exigencias que deben respetarse en la planificación y puesta en práctica de los planes nacionales de control de los residuos en animales vivos y en productos de origen animal. El objetivo principal que se persigue es detectar el uso de sustancias ilegales en la producción animal y el uso indebido de productos veterinarios autorizados, así como garantizar la aplicación de medidas adecuadas para minimizar la reaparición de este tipo de residuos en los alimentos de origen animal. En virtud de esta normativa, los Estados miembros están obligados a presentar cada año **planes nacionales de control de los residuos**, para que sean aprobados por la Comisión Europea. Entre las sustancias indeseables consideradas por esta directiva se encuentran compuestos **organoclorados**, compuestos **organofosforados**, **piretroides** y carbamatos; mientras que los animales y productos abarcados incluyen bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, équidos, aves de corral, conejos, caza silvestre y de cría, acuicultura, miel, **leche** y huevos. [7]

En lo que a los residuos de sustancias indeseables en **leche** se refiere, la Unión Europea (EU) ha establecido **MRLs** para una parte importante de los pesticidas estudiados en esta Tesis [8]. Por otro lado, también se han establecido límites legales para proteger a los consumidores de la exposición a niveles inaceptables de pesticidas en piensos y en los principales cultivos empleados para su elaboración. Así, de acuerdo con la **directiva europea 2002/32/EC** acerca de sustancias indeseables en **alimentos para animales**, se establecieron MRLs comprendidos entre 5 y 2000 ng g⁻¹ para los pesticidas organoclorados más comunes [9]. Además, en Septiembre del 2008 entró en vigor en la Unión Europea una nueva regulación que armoniza los límites aplicables y que cubre no sólo los productos para consumo humano si no también para la alimentación animal [8, 10]. Esta regulación incluye pesticidas usados en el ámbito agrícola actualmente y también en el pasado, tanto dentro como fuera de la EU y plantea la pregunta de en qué medida se verá afectada la directiva actual 2002/32/EC, ya que ésta no menciona ningún pesticida de uso reciente moderno. Además, si no se alude específicamente a un determinado fitosanitario, se le aplica por defecto un MRL de 10 ng g⁻¹. En la Tabla I.1.2 se muestran los MRLs establecidos por la legislación europea actual para los pesticidas estudiados en esta Tesis en leche, alimentos para

animales e ingredientes más comunes en piensos de ganado (cebada, semilla de soja, maíz y trigo).

Tabla I.1.2 Legislación europea vigente en relación a los MRLs de los pesticidas investigados en leche, en alimentos para animales y en los ingredientes más habituales empleados para la elaboración de piensos de ganado [8-10].

Pesticida	MRL ng g ⁻¹	Legislación en alimentos para animales (contenido en humedad del 12%)		MRL ng g ⁻¹			
	leche	productos destinados a la alimentación de animales	MRL ng g ⁻¹	cebada	semilla de soja	maíz	trigo
Aldrina y Dieldrina ^a	6	Todos los alimentos para animales a excepción de: grasas	10 200	10	20	10	10
Clordano ^b	2	Todos los alimentos para animales a excepción de: grasas	20 50		20		
DDT ^c	40	Todos los alimentos para animales a excepción de: grasas	50 500	50	50	50	50
Endosulfán ^d	50	Todos los alimentos para animales a excepción de: maíz semillas de aceite alimentos completos para peces	100 200 500 5	50	500	50	50
Endrina		Todos los alimentos para animales a excepción de: grasas	10 50	10	10	10	10
Heptacloro ^e	4	Todos los alimentos para animales a excepción de: grasas	10 200	10	10	10	10
α-Lindano		Todos los alimentos para animales a excepción de: grasas	20 200				
β-Lindano		Alimentos compuestos para animales a excepción de: alimentos para ganado vacuno	10 5				
		Componentes de piensos a excepción de: grasas	10 100				
γ-Lindano	1	Todos los alimentos para animales a excepción de: grasas	200 2000	10	10	10	10
Metoxicloro	10			10	10	10	10
Acetocloro	10			10	10	100	10
Alacloro	10			50	200	200	50
Clorpirifos	10			200	50	50	50
Fenitrotion				500	10	500	500

^aaldrina y dieldrina combinados

^bsuma de α- y γ-clordano

^csuma de p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDE y p,p'-DDD

^dsuma de los isómeros I, II y sulfato de endosulfán

^esuma de heptacloro y epóxido de heptacloro

1. PESTICIDAS

Tabla I.1.2 Legislación europea vigente en relación a los MRLs de los pesticidas investigados en leche, en alimentos para animales y en los ingredientes más habituales empleados para la elaboración de piensos de ganado [8-10], (continuación).

Pesticida	MRL ng g ⁻¹	Legislación en alimentos para animales (contenido en humedad del 12%)			MRL ng g ⁻¹		
	leche	productos destinados a la alimentación de animales	MRL ng g ⁻¹	cebada	semilla de soja	maíz	trigo
Ciflutrina ^f	20			20	20	50	20
λ-Cihalotrina	50			50	50	20	20
Cipermetrina ^f	20			2000	50	50	2000
Deltametrina ^g	50			2000	50	2000	2000
Fenotrina	50			50	50	50	50
Fenvalerato y Esfenvalerato (RR+SS)	20			200	50	20	50
Fenvalerato y Esfenvalerato (RS+SR)				50	50	20	20
Flucitrinato	50			50	50	50	50
Permetrina ^f	50			50	50	50	50
Teflutrina	50			50	50	50	50

^fsuma de isómeros

^gMRL para *cis*-deltametrina

Por otro lado, la regulación de **sitios contaminados** está recibiendo cada vez más atención en la EU y, en Septiembre del 2006, la Comisión Europea adoptó una estrategia exhaustiva dedicada a la protección de los suelos. Sin embargo, actualmente sólo nueve estados miembros de la EU poseen legislación específica relativa a la **protección de suelos** [11]. España es uno de esos países y fue en el 2005 cuando el gobierno introdujo una regulación para la evaluación y control de suelos contaminados. De acuerdo con esta directiva, un suelo se declarará contaminado cuando en él se identifiquen riesgos inaceptables para la protección de la salud humana (o del ecosistema) debidos a la presencia de los compuestos incluidos en el **Real Decreto Español 9/2005**, siendo la mayoría de ellos compuestos organoclorados y aromáticos. Para evaluar la contaminación de los suelos se han propuesto **niveles de referencia genéricos** en función del uso del suelo (industrial, urbano u otros) [12]. En la Tabla I.1.3 se incluyen los niveles de referencia genéricos establecidos para los pesticidas estudiados en esta Tesis por la legislación española para la protección de la salud humana. Tal y como se deduce de la tabla, menos de la mitad de los fitosanitarios investigados en este trabajo están legislados, siendo todos ellos **organoclorados**.

Tabla I.1.3 Niveles de referencia genéricos en suelo establecidos por la legislación española para los pesticidas investigados [12].

Pesticida	Niveles de referencia genéricos para la protección de la salud humana (mg/Kg)		
	uso industrial	uso urbano	otros usos*
Aldrina	1	0,1	0,01
Clordano	1	0,1	0,01
4,4'-DDD	70	7	0,7
4,4'-DDE	60	6	0,6
4,4'-DDT	20	2	0,2
Dieldrina	1	0,1	0,01
Endosulfán	60	6	0,6
Endrina	1	0,1	0,01
Epóxido de heptacloro	1	0,1	0,01
α -Lindano	1	0,1	0,01
β -Lindano	1	0,1	0,01
γ -Lindano	1	0,1	0,01

*incluye actividades agrícolas

En los siguientes apartados de este Capítulo I.1 se describirán con mayor profundidad los distintos grupos de pesticidas estudiados en esta Tesis. Se ha prestado especial atención a los **piretroides** ya que, junto con los organoclorados, son el grupo de fitosanitarios más numeroso de los incluidos en este trabajo; además, la bibliografía relativa a estos compuestos es bastante escasa si se compara con la gran cantidad de información publicada acerca de los pesticidas organoclorados.

1.5 PESTICIDAS PIRETROIDES

1.5.1 INTRODUCCIÓN

El **piretro** es el extracto natural derivado de las flores de las plantas *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Figura I.1.3) y *Chrysanthemum cinereum*. Desde hace tiempo se sabe que el piretro posee propiedades insecticidas y fue en Asia, alrededor del año 1800, cuando se comenzó a emplear este extracto para la manufactura de productos antipulgas y antipiojos. Los seis compuestos activos del piretro se llaman **piretrinas**. Las piretrinas individuales son: piretrina I, piretrina II, jasmolina I, jasmolina II, cinerina I y cinerina II. Estos compuestos son ésteres de dos ácidos carboxílicos (ácido crisantémico, para la serie I, y ácido pirétrico, para la serie II) y de tres ciclopentenolonas (piretrolona, jasmolona y cinerolona) [13]. Las estructuras de las seis piretrinas se muestran en la Figura I.1.3.

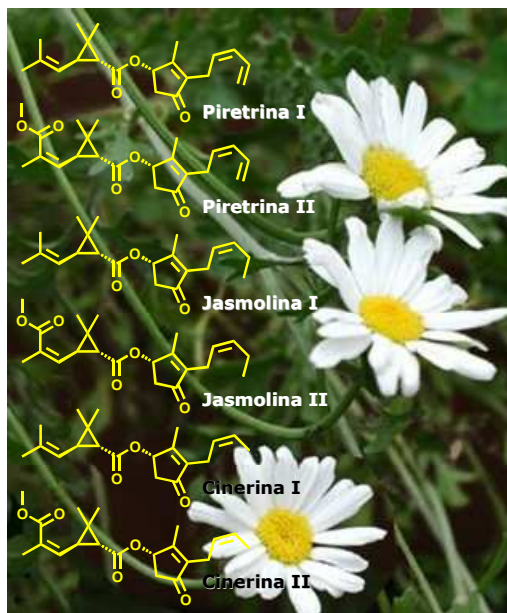


Figura I.1.3 Estructura de las piretrinas [14] y fotografía de la planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*.

El principal inconveniente del piretro como insecticida es su **inestabilidad** a la luz y al aire, lo que limita su efectividad en la protección de cultivos y en otros contextos del control de insectos en los que la actividad residual del pesticida es esencial. Los esfuerzos por modificar la estructura de las piretrinas naturales con el objetivo de incrementar la fotoestabilidad, manteniendo la actividad insecticida y la relativa baja toxicidad aguda hacia los mamíferos, condujeron al desarrollo de los **piretroides sintéticos**. La mayoría de los piretroides sintéticos se desarrollaron partiendo de la sustitución secuencial de elementos estructurales de las piretrinas por elementos estructurales novedosos seleccionados para conservar la forma molecular y las propiedades físicas de la estructura original. Las piretrinas son ésteres de un ácido ciclopropanocarboxílico y de un alcohol ciclopentenolona y, en un principio, las

modificaciones sintéticas mantuvieron constante una de estas partes de la molécula mientras que en la otra se introducían nuevas características estructurales. Sin embargo, en las siguientes etapas de diseño de los nuevos compuestos se emplearon como plantillas los recién descubiertos piretroides con la actividad insecticida, la estabilidad y otras propiedades deseadas [15]. De manera que, aunque están basados en la estructura química y en la actividad biológica de las piretrinas, el desarrollo sintético de los piretroides ha supuesto modificaciones químicas importantes que hacen que estos compuestos sean menos degradables en el medioambiente pero también más tóxicos [16].

El uso de estos pesticidas reside en el **control de plagas** de insectos en la agricultura, en el ámbito doméstico y en el almacén de productos [16] y, a menudo, se formulan con compuestos como el **butóxido de piperonilo** (del que se hablará en el Apartado 1.5.7), el sulfóxido de piperonilo y el *sesamex*, que funcionan como **sinergistas** incrementando la efectividad del insecticida [13].

1.5.2 ESTRUCTURA

La mayoría de los piretroides son **ésteres** sintéticos derivados de las piretrinas. Sin embargo, también hay un grupo de éteres oxima que exhiben una actividad insecticida similar a la de las piretrinas y los ésteres piretroides; pero se dispone de pocos datos acerca de estos compuestos y no se han fabricado productos comerciales de los mismos [13]. Por otro lado, un gran número de insecticidas piretroides presentan un **anillo ciclopropánico** aunque otros, como el fenvalerato y el flucitrinato, carecen de dicho elemento estructural.

La química y la actividad de los piretroides permite clasificarlos en **dos grupos** (Tipo I y Tipo II) dependiendo del sustituyente alcohol. El grupo **Tipo I** es muy amplio e incluye a los piretroides que contienen el grupo **desciano-3-fenoxibencilo** (p. ej. fenotrina) u **otros alcoholes** (p. ej. aletrina, empentrina, transflutrina). En cuanto a los piretroides de **Tipo II**, están más estrechamente definidos en términos de su estructura química puesto que contienen específicamente el grupo **α -ciano-3-fenoxibencilo** (p. ej. cifenotrina) [17].

1. PESTICIDAS

En la Tabla I.1.4 se incluyen las **estructuras químicas** de los piretroides estudiados en este trabajo, así como sus nombres comunes y sus números y nombres CAS.

Tabla I.1.4 Identidad química de los piretroides estudiados.

Nombre común [nº CAS]	Nombre CAS	Estructura química
Aletrina [584-79-2]	2-metil-4-oxo-3-(2-propen-1-il)-2-ciclopenten-1-il éster del ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propen-1-il)ciclopropanocarboxílico	
Cifenotrina [39515-40-7]	ciano(3-fenoxifenil)metil éster del ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propen-1-il)ciclopropanocarboxílico	
Ciflutrina [68359-37-5]	ciano(4-fluoro-3-fenoxifenil)metil éster del ácido 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	
λ-Cihalotrina [91465-08-6]	mezcla 1:1 de: (R)-ciano(3-fenoxifenil)metil éster del ácido (1S,3S)-3-[(1Z)-2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propen-1-il]-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	
	(S)-ciano(3-fenoxifenil)metil éster del ácido (1R,3R)-3-[(1Z)-2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propen-1-il]-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	
Cipermetrina [52315-07-8]	ciano(3-fenoxifenil)metil éster del ácido 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	
Deltametrina [52918-63-5]	(S)-ciano(3-fenoxifenil)metil éster del ácido (1R,3R)-3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	
Empentrina [54406-48-3]	1-etinil-2-metil-2-penten-1-il éster del ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propen-1-il)ciclopropanocarboxílico	

Tabla I.1.4 Identidad química de los piretroides estudiados, (continuación).

Nombre común [n° CAS]	Nombre CAS	Estructura química
Fenotrina [26002-80-2]	(3-fenoxifenil)metil éster del ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propen-1-il)ciclopropanocarboxílico	
Fenvalerato [51630-58-1]	ciano(3-fenoxifenil)metil éster del ácido 4-cloro- α -(1-metiletil)bencenoacético	
Flucitrinato [70124-77-5]	ciano(3-fenoxifenil)metil éster del ácido 4-(difluorometoxi)- α -(1-metiletil)bencenoacético	
Permetrina [52645-53-1]	(3-fenoxifenil)metil éster del ácido 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	
Teflutrina [79538-32-2]	(2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilfenil)metil éster del ácido (1R,3R)-3-[(1Z)-2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propen-1-il]-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	
Tetrametrina [7696-12-0]	(1,3,4,5,6,7-hexahidro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-il)metil éster del ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propen-1-il)ciclopropanocarboxílico	
Transflutrina [118712-89-3]	(2,3,5,6-tetrafluorofenil)metil éster del ácido (1R,3S)-3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico	

1.5.3 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

En general, las piretrinas y los piretroides tienen bajas presiones de vapor, elevados coeficientes de partición octanol/agua (K_{ow}) y son poco solubles en agua [13].

En la Tabla I.1.5 se resumen las **propiedades físico-químicas** de los piretroides estudiados.

Tabla I.1.5 Propiedades físico-químicas de los piretroides estudiados [13].

Pesticida	Presión de vapor mmHg (25 °C)	Coefficiente de partición log K_{ow}	Solubilidad en agua mg L⁻¹
Aletrina	1,2·10 ⁻⁶ (21 °C)	4,8	4,6 (25 °C)
Cifenoctrina [18]	<5,64·10 ⁻¹² (20 °C)	>6	<10 ⁻⁵ (25 °C)
Ciflutrina	2,03·10 ⁻⁹	5,94	0,002 (20 °C)
λ-Cihalotrina	1,5·10 ⁻⁹ (20 °C)	6,9	0,003 (20 °C)
Cipermetrina	3,07·10 ⁻⁹ (20 °C)	6,6	0,004 (20 °C)
Deltametrina	1,5·10 ⁻⁸	6,1	<0,002
Empentrina [19]	1,05·10 ⁻⁴ (23,6 °C)	5,9 [20]	0,111
Esfenvalerato ^a	1,5·10 ⁻⁹	4,0	0,0002 (25 °C)
Fenotrina	1,4·10 ⁻⁷	7,54	2,0 (30 °C)
Flucitrinato	8,5·10 ⁻⁹	4,7	0,5 (21 °C)
Permetrina	2,2·10 ⁻⁸	6,5	0,006 (20 °C)
Teflutrina	6,0·10 ⁻⁵	6,5	0,002 (20 °C)
Tetrametrina	7,1·10 ⁻⁶	4,6	1,83
Transflutrina [21]	4,12·10 ⁻⁵ [20]	5,46	0,057 (20 °C)

^aS,S-Fenvalerato

1.5.4 USOS

En la Tabla I.1.6 se resumen las principales **aplicaciones** de los piretroides investigados.

Tabla I.1.6 Principales usos de los piretroides estudiados [13].

Pesticida	Insectos	Cultivos	Otras localizaciones y aplicaciones
Aletrina	moscas, mosquitos, hormigas	no procede	edificios residenciales, salud pública, casetas de animales, aplicación tópica en sprays y champús de mascotas
Cifenotrina	moscas, mosquitos, cucarachas	no procede	salud pública
Ciflutrina	áfidos, escarabajos y pulgas de los tallos de los repollos, cucarachas, moscas, mosquitos, gorgojo de la corza de invierno	alfalfa, cereales, algodón, cítricos, frutas de caducifolios, cacahuetes, maíz, semilla de colza, perales, patatas, arroz, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, hortalizas	invernaderos
Cihalotrina ^a	chinchas, escarabajos, mosca doméstica, parásitos en ovejas, piojos, mosquitos, polillas, gorgojos	no procede	salud pública, casetas de animales, superficies inertes
Cipermetrina	cucarachas, moscas, mosquitos, polillas	algodón, lechuga, cebollas, perales, melocotoneros, nogales, remolacha azucarera	edificios residenciales y comerciales, casetas de animales
Deltametrina	pulgones, escarabajos, gusanos del algodón, lombrices, orugas, cigarras, polillas, gorgojos, mosca blanca, polillas de invierno	alfalfa, remolacha, cereales, café, algodón, higos, frutas, lúpulo, maíz, semilla de colza, aceitunas, palmeras de aceite, patatas, arroz, soja, girasoles, té, tabaco, hortalizas	bosques, hogares, casetas de animales, productos almacenados

^ael isómero λ se usa principalmente como pesticida agrícola en una gran variedad de cultivos

1. PESTICIDAS

Tabla 1.1.6 Principales usos de los piretroides estudiados [13], (continuación).

Pesticida	Insectos	Cultivos	Otras localizaciones y aplicaciones
Empentrina [22]	polillas y otros insectos que dañan la ropa	no procede	hogares
Fenotrina	hormigas, chinches, cucarachas, pulgas, moscas domésticas, piojos, mosquitos, garrapatas	no procede	edificios públicos, cereales almacenados, sprays y champús para mascotas
Fenvalerato	escarabajos, cucarachas, moscas, langostas, mosquitos, polillas	alfalfa, manzanas, remolacha, cereales, algodón, maíz, cucurbitas, fruta, judías verdes, cacahuetes, lúpulos, nueces, semilla de colza, aceitunas, patatas, sorgo, soja, calabaza, caña de azúcar, girasol, hortalizas, vides, tabaco	plantas ornamentales, silvicultura, terrenos no-cultivables
Flucitrinato	gusanos del algodón, gusanos de hoja, insecto chupóptero, moscas blancas, escarabajo	algodón, vides, fresas, cítricos, bananas, piñas, olivas, café, cacao, lúpulos, hortalizas, soja, cereales, maíz, alfalfa, remolacha azucarera, girasoles, tabaco	no procede
Permetrina	hormigas, escarabajos, gusanos de algodón, lombrices, pulgas, moscas, piojos, polillas, mosquitos, termitas, gorgojos	alfalfa, heno, maíz, algodón, cereales, lechuga, cebollas, melocotones, patatas, maíz dulce, tomates, trigo	jardines, invernaderos, sprays y champús para mascotas
Teflutrina	escarabajos, moscas domésticas, gorgojos, mosquitos, polillas	maíz, remolacha azucarera, maíz dulce	no procede

Tabla I.1.6 Principales usos de los piretroides estudiados [13], (continuación).

Pesticida	Insectos	Cultivos	Otras localizaciones y aplicaciones
Tetrametrina	moscas, cucarachas, mosquitos, avispas	maíz, remolacha azucarera, maíz dulce	no procede
Transflutrina [23]	polillas, escarabajos que dañan la ropa	no procede	ámbito doméstico: armarios, cajas, maletas en las que se almacenan ropa, colchones, cortinas, alfombras, etc.

1.5.5 TOXICIDAD

Las piretrinas son compuestos de baja toxicidad para los mamíferos, sin embargo, la toxicidad de los piretroides puede ser significativamente mayor. A pesar de todo, tanto unos como otros son mucho **menos dañinos** para los mamíferos que para los insectos por dos razones:

1. La **limitada absorción dérmica** de estos pesticidas en los mamíferos.
2. La **ausencia en los insectos de ciertas enzimas hepáticas** que poseen los mamíferos y que llevan a cabo una rápida biodegradación de las piretrinas y de los piretroides a través de la hidrólisis del enlace éster. [24]

1.5.5.1 Modo de acción

La toxicidad de los piretroides en mamíferos y la actividad insecticida de los mismos están provocadas por mecanismos similares [25]. Como el DDT y muchos otros insecticidas, las piretrinas y los piretroides afectan al **sistema nervioso**. El principal mecanismo de acción se cree que consiste en la interrupción de la permeabilidad de las membranas nerviosas a los átomos de sodio. No se conoce el lugar de acción, pero los piretroides probablemente actúan tanto en el sistema nervioso central (cerebro y

espinas dorsal) como en el periférico (nervios en otras partes del cuerpo) [17]. Los piretroides de **Tipo I** causan principalmente **temblores** (síndrome-T) y los piretroides de **Tipo II** provocan **coreoatetosis** y **salivación** (síndrome-CS). No obstante, piretroides como la permetrina exhiben características (T y CS) de ambos grupos [25].

1.5.5.2 Relación entre estereoquímica y toxicidad

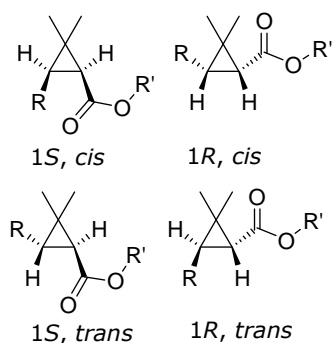


Figura I.1.4 Isomerismo en el anillo ciclopropano.

La **toxicidad** de los piretroides depende mucho de la **estereoquímica** de la molécula. Algunos piretroides pueden llegar a tener hasta 16 isómeros y cada isómero tiene su propia toxicidad [16]. En los piretroides que poseen el anillo ciclopropano, el isomerismo en torno a dicho anillo afecta de manera importante a la toxicidad de estos insecticidas. La presencia de dos centros quirales en el anillo conduce a la existencia de dos pares de diastereoisómeros. Estos diastereoisómeros y sus enantiómeros se muestran en la Figura I.1.4. Las conformaciones **1R** en el anillo

ciclopropano son considerablemente **más tóxicas** que las 1S. Por otro lado, tanto los isómeros *cis* como los *trans* muestran **actividad insecticida**, pero poseen diferentes toxicidades hacia los mamíferos siendo los isómeros ***cis* más potentes**. Además, los piretroides que contienen un sustituyente ciano en la parte alcohol (**Tipo II**) muestran una toxicidad diferente en función del isomerismo óptico del carbono α . Se ha demostrado que la **conformación S** alrededor del **carbono α** es considerablemente **más tóxica** hacia los insectos si se compara con la conformación *R*. La producción de piretroides con diferentes relaciones isoméricas es una de las razones por las que hay una gran variedad en las toxicidades de estos compuestos [13].

1.5.5.3 Toxicidad aguda en mamíferos

La toxicidad aguda en mamíferos varía mucho de un piretroide a otro. En general son **menos tóxicos** que los pesticidas organofosforados, carbamatos y organoclorados, aunque hay algunas excepciones (deltametrina, teflutrina, cihalotrina, fenpropatrina, flucitrinato, bifentrina y esfenvalerato) con toxicidades orales agudas superiores.

Diversos estudios han mostrado que los principales efectos de los piretroides son **neurotoxicidad** a altas dosis e **hipertrofia en el hígado**. Si no se produce la muerte, estos cambios se ha visto que son reversibles. Además, muchos piretroides pueden ser ligera o severamente irritantes de la piel y de los ojos.

1.5.5.4 Toxicidad crónica y subcrónica

Los efectos crónicos y subcrónicos no-cancerosos más notables en mamíferos son los **signos de toxicidad aguda**, que habitualmente son temporales y que disminuyen considerablemente si la exposición crónica continúa. Otros efectos crónicos son la reducción en la velocidad de crecimiento, el aumento del hígado y el incremento en la actividad de algunas enzimas hepáticas. Estos cambios no son completamente reversibles.

1.5.5.5 Mutagenicidad y carcinogenicidad

En varios estudios realizados, la aletrina y otros piretroides como la cipermetrina y la permetrina han mostrado algunos efectos mutagénicos, pero la respuesta (cambios en el tuétano de los ratones) sólo fue importante en el caso de la permetrina. A pesar de estos resultados, se considera que el **potencial mutagénico** de los piretroides es **muy bajo** si no inexistente. Estudios de carcinogenicidad de la permetrina, la deltametrina, la resmetrina y el fenvalerato han mostrado incrementos en varios tipos de cáncer, pero sólo la **permetrina** ha sido considerada por la EPA como **potencial o débil carcinógeno**. [16]

1.5.5.6 Disrupción endocrina

Numerosos compuestos químicos presentes en el medioambiente poseen **actividades hormonales** y, por lo tanto, han sido clasificados como **disruptores endocrinos** [26]. Muchos de estos compuestos (y/o los productos de su metabolismo o degradación) interaccionan con receptores de esteroides (estrógeno/andrógeno) imitando (agonistas) o bloqueando (antagonistas) el efecto de las hormonas esteroideas sexuales [27].

Se ha relacionado a muchos piretroides con la disrupción del sistema endocrino, lo que puede afectar negativamente a la reproducción y al desarrollo sexual, interferir con el sistema inmune e incrementar las posibilidades de sufrir cáncer de pecho [28]. Además, se han publicado trabajos en los que se ha mostrado que algunos de los **metabolitos** o **productos de degradación** medioambiental de los piretroides, más que los compuestos de partida, son motivo de preocupación en lo que respecta a su habilidad para interactuar con receptores hormonales [27, 29].

1.5.5.7 Exposición humana

Mientras que la **inhalación** es la principal ruta de exposición en los obreros industriales, el **contacto con la piel** lo es en los trabajadores que se dedican a aplicar piretroides en la agricultura o en el ámbito de la salud pública. La exposición de la población general puede ocurrir por inhalación, por contacto de la piel con productos, por la ingestión de alimentos con residuos de piretroides o por la bebida accidental de productos que contengan estos insecticidas. [25]

1.5.5.8 Efectos en otros organismos no-objetivo

La toxicidad aguda de los piretroides en los **pájaros** es moderada, con valores de LD_{50} que en la mayoría de los casos son superiores a 1000 mg kg^{-1} . Aún así, los pájaros pueden verse afectados por los piretroides si éstos diezman o perturban sustancialmente sus víveres. Las aves acuáticas son especialmente vulnerables ya que se alimentan casi exclusivamente de invertebrados acuáticos, pequeños insectívoros o pájaros jóvenes. Y es que los piretroides tienen un efecto devastador en los invertebrados acuáticos con valores de LC_{50} muchas veces inferiores a 1 ng mL^{-1} .

Los piretroides son muy tóxicos para la mayoría de los **peces**; aproximadamente un 40% de los valores de LC_{50} para los peces son inferiores a 1 ng mL^{-1} . La deltametrina es uno de los más tóxicos, la aletrina uno de los menos tóxicos y la cipermetrina y la permetrina presentan una toxicidad intermedia. Aunque son menos tolerantes que la mayoría de los mamíferos, los **anfibios** y los **moluscos** son mucho más resistentes hacia los piretroides que la mayoría de los peces y crustáceos.

Por otra parte, los piretroides son tóxicos para los insectos, ya sean beneficiosos o plagas. Así por ejemplo, la mayoría de estos insecticidas son muy tóxicos para las **abejas** y el valor de LD₅₀ para la abeja de miel puede llegar a ser de 0,03 µg por abeja. [16]

1.5.6 DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE

1.5.6.1 Liberación al medioambiente

La liberación al **aire** representa la ruta de emisión más importante de las piretrinas y los piretroides, puesto que la mayoría de las aplicaciones de estos insecticidas suponen el rocío aéreo o del suelo de cultivos u otra vegetación (Figura I.1.5), así como el uso de bombas de aerosol y sprays de interior. Sin embargo, el Parlamento Europeo ha aprobado recientemente una nueva legislación que deberá ser implementada por los Estados miembros a principios del 2011 y, según la cual, se prohibirá la aplicación aérea de fitosanitarios [30].



Figura I.1.5 Aplicación aérea de pesticidas desde un avión.

La liberación directa al **agua** se espera que sea baja, aunque la dispersión del spray tras la aplicación de estos compuestos puede, sin embargo, contaminar aguas cercanas. Las **aguas de escorrentía** de campos de cultivo o de industrias también pueden contener piretrinas y piretroides.

Habitualmente, la liberación al **suelo** es consecuencia de la deposición de los pesticidas tras su dispersión aérea sobre los cultivos o la vegetación, aunque el desecho inapropiado también puede explicar parte de su presencia en el suelo.

1.5.6.2 Transporte y reparto

La **dispersión** del spray de cualquier pesticida tras su aplicación es una fuente importante de contaminación medioambiental y es responsable de una parte significativa de su transporte aéreo. Basándose en su presión de vapor (Tabla I.1.5), es de esperar que los piretroides existan en la atmósfera tanto en fase vapor como en fase particulada.

Estos compuestos se **adsorben** fuertemente a la superficie del suelo y no se consideran demasiado móviles. Este comportamiento es coherente con los valores de los coeficientes de partición octanol/agua (K_{ow}) de los piretroides (Tabla I.1.5), que ya predicen un elevado grado de adsorción y poco potencial de lixiviado.

La **volatilización** desde el agua y el suelo se espera que ocurra lentamente para muchos de los piretroides puesto que estos insecticidas generalmente tienen bajas presiones de vapor y bajas constantes de Henry.

Cuando estos pesticidas se liberan al agua, se produce el rápido reparto hacia los sedimentos y los sólidos suspendidos. La fuerte adsorción de estos compuestos sobre estas superficies atenúa significativamente los procesos de volatilización. Por otro lado, las pérdidas por volatilización desde las hojas son considerablemente mayores que por volatilización desde los suelos.

En lo que respecta a los piretroides que se usan en el interior en forma de sprays o aerosoles, las velocidades de volatilización desde superficies de vidrio o pisos quizás sean significativamente mayores que desde suelos puesto que estos compuestos no se adsorben tan fuertemente a estas superficies.

1.5.6.3 Transformación y degradación

En el **aire**, los piretroides que están en fase vapor se degradan rápidamente a través de su **reacción con oxidantes** atmosféricos o por **fotólisis** directa, mientras que los que están en fase particulada se degradan más lentamente.

En el **agua**, estos pesticidas también se degradan mediante **fotólisis** en aguas superficiales, y la velocidad de degradación se ve incrementada por agentes fotosensibilizantes que se encuentran en aguas naturales como son los ácidos fúlvicos y húmicos. Generalmente, la **hidrólisis** sólo es importante bajo condiciones alcalinas y a temperaturas de 20 °C o mayores. Además, los piretroides se degradan fácilmente por acción de **microorganismos**.

En el **suelo**, los piretroides se degradan más rápidamente que muchos pesticidas organoclorados, organofosforados y carbamato. La **biodegradación** juega un papel importante en la desaparición de estos compuestos en suelos. Por otro lado, puesto que la luz se atenúa en función de la profundidad desde la superficie del suelo, la **fotólisis** de piretrinas y piretroides es sólo un proceso de destino medioambiental importante en la superficie.

Una parte importante de esta Tesis está dedicada al estudio de la degradación de los piretroides por acción de la luz. Por ello, se ha considerado apropiado el ampliar la información relativa a la **fotodegradación** de estos pesticidas, información a la que se le ha dedicado el **Capítulo I.5** de esta Introducción.

1.5.6.4 Niveles en el medioambiente

Los piretroides se han detectado frecuentemente en el **aire** de hogares y edificios después de haber sido utilizados. Puesto que estos pesticidas se adsorben fuertemente a los suelos, no se suelen detectar a concentraciones elevadas ni en **aguas subterráneas** ni en **aguas potables**. Finalmente, se han detectado piretroides en **suelos agrícolas** o **sedimentos** de lagos, ríos y riachuelos contaminados por la dispersión de sprays o por aguas de escorrentía. [13]

1.5.7 BUTÓXIDO DE PIPERONILO (PBO)

Los piretroides se pueden metabolizar por acción de enzimas presentes en los insectos, lo que a menudo provoca que un insecto inicialmente paralizado pueda sobrevivir y recuperar la función neurológica. Puesto que esta desintoxicación metabólica es un factor importante que limita la actividad insecticida, los pesticidas a

menudo se formulan en combinación con **sinergistas**, incrementando de esta manera la efectividad de los mismos [13, 28, 31]. El **butóxido de piperonilo** (PBO) es un sinergista desarrollado en 1947 que se utiliza en una gran variedad de formulaciones que contienen piretrinas, piretroides, rotenona y carbamatos. [32]

El nombre CAS del **PBO** [nº CAS 51-03-6] es 5-[[2-(2-butoxi)etoxi]etil]-6-propil-1,3-benzodioxol, y su **estructura** se muestra en la Figura I.1.6.

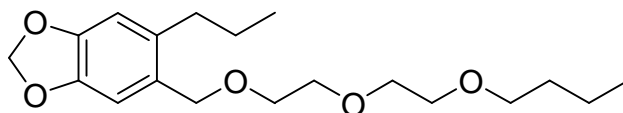


Figura I.1.6 Estructura del butóxido de piperonilo.

En cuanto a sus **propiedades físico-químicas**, el PBO presenta una solubilidad en agua de 14,3 mg L⁻¹ (25 °C), una presión de vapor de 9,98·10⁻⁸ mmHg (25 °C) y un coeficiente de partición octanol/agua (log K_{ow}) de 4,62. [33]

El PBO se utiliza como **sinergista** en los siguientes productos:

- pesticidas de uso doméstico de interior,
- pesticidas para jardines, céspedes y plantas decorativas,
- pesticidas agrícolas para cultivos comestibles y no comestibles,
- productos para el control de mosquitos,
- tratamientos contra termitas,
- productos pesticidas veterinarios,
- pesticidas para la ropa, colchones y ropa de cama. [32]

Los efectos del PBO en la salud humana y en el medioambiente dependen de la cantidad presente y de la duración y frecuencia de la exposición, así como de la salud de la persona y/o de ciertos factores medioambientales. Su **toxicidad** es muy baja cuando es ingerido por mamíferos y cuando es inhalado por ratas. Además, la toxicidad en mamíferos es de baja a muy baja cuando es absorbido por la piel. La EPA ha clasificado a este sinergista como **carcinógeno del grupo C**, es decir, se considera

que es un posible carcinógeno para humanos basándose en la limitada evidencia de cáncer en los animales de laboratorio. [32]

En lo que se refiere a su **distribución en el medioambiente**, los estudios que evaluaron la desaparición del PBO en suelo y agua concluyeron que se trata de un compuesto **poco persistente**. Además, el PBO tiene poca tendencia a contaminar aguas subterráneas. Cuando se libera hacia el aire en estado líquido termina asentándose en el suelo, mientras que si se libera en fase gaseosa se degrada rápidamente en el aire. [32]

1.6 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

1.6.1 INTRODUCCIÓN

Un número importante de pesticidas organoclorados pertenecen al grupo de los **contaminantes orgánicos persistentes (POPs)**, los cuales han sido y son un motivo de preocupación importante debido a su existencia a elevadas concentraciones, incluso en ecosistemas remotos, y a pesar de las prohibiciones de su producción y uso [34, 35]. Son compuestos con una toxicidad de amplio espectro y persistentes, por lo que se acumulan en la cadena alimentaria, implicando altos riesgos tanto para el ecosistema como para la salud humana. [36].

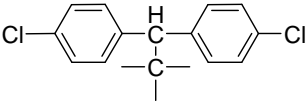
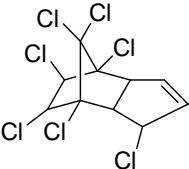
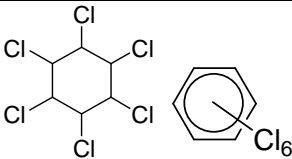
La **inquietud medioambiental** provocada por el uso generalizado de sustancias tóxicas, como son los pesticidas organoclorados, ha incrementado las **restricciones** en su producción y uso, primero en los países desarrollados y, más recientemente, también en los países en vías de desarrollo. Así, los pesticidas organoclorados están controlados y gobernados por numerosas regulaciones internacionales entre las que destaca el **Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes** (*Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*), firmado en 2001 por cerca de 120 países. Este Convenio entró en vigor el 17 de Mayo de 2004 y su objetivo es el de conseguir la continua minimización y, de ser factible, la completa eliminación de los POPs. Actualmente, ya son 162 los Estados que forman parte de dicho Convenio. En esta primera fase se han fijado como objetivo sólo doce POPs, conocidos como la

docena sucia. La *docena sucia* incluye, además de **PCBs, dioxinas y furanos**, los principales **pesticidas organoclorados**: aldrina, clordano, DDT, dieldrina, endrina, heptacloro, hexaclorobenceno (HCB), *mirex* y toxafeno. El Convenio de Estocolmo requiere de todos los estados miembros el cese en la producción de los pesticidas aldrina, dieldrina y heptacloro. Los países con exenciones deberán restringir el uso de estos pesticidas a propósitos concretos y por períodos de tiempo limitados. En cuanto a la producción y uso de clordano, HCB y *mirex*, se han limitado a fines prescritos y en países en los que se hayan registrado para determinadas exenciones. Por lo que al DDT se refiere, su producción y uso está confinado al control de enfermedades como la malaria. [37]

1.6.2 ESTRUCTURA

Estructuralmente, los pesticidas organoclorados se pueden dividir en tres grupos: **análogos del DDT, derivados del ciclodieno, y ciclohexanos y bencenos clorados** (Tabla I.1.7).

Tabla I.1.7 Clasificación estructural de los pesticidas organoclorados.

Análogos del DDT		4,4'-DDT, 4,4'-DDD, Dicofof, Pertano, Metoxicloro
Ciclodienos		Aldrina, Clordano, Dieldrina, Endosulfán, Endrina, Heptacloro
Ciclohexanos y bencenos clorados		α -Lindano, β -Lindano, γ -Lindano, δ -Lindano, HCB

En la Tabla I.1.8 se muestran las estructuras de los organoclorados estudiados en esta Tesis, así como sus nombres comunes y sus números y nombres CAS.

Tabla I.1.8 Identidad química de los organoclorados estudiados.

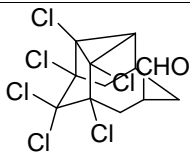
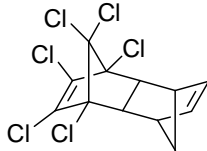
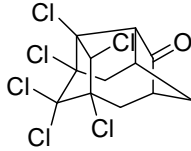
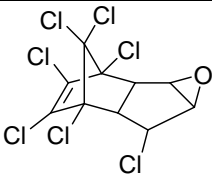
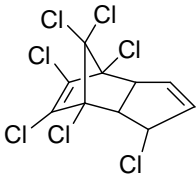
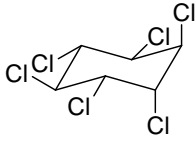
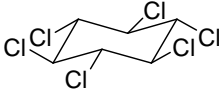
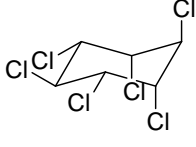
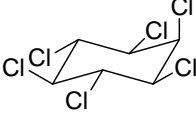
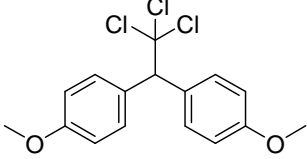
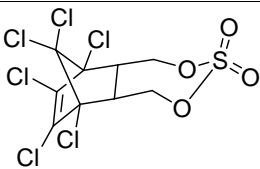
Nombre común [n° CAS]	Nombre CAS	Estructura química
Aldehído de endrina [7421-93-4]	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,2 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>aR</i> ,6 <i>bR</i> ,7 <i>S</i>)-2,2 <i>a</i> ,3,3,4,7-hexaclorodecahidro-1,2,4-metenociclopenta[<i>cd</i>]pentaleno-5-carboxaldehído	
Aldrina [309-00-2]	(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4 <i>a</i> ,5,8,8 <i>a</i> -hexahidro-1,4:5,8-dimetanonaftaleno	
Cetona de endrina [53494-70-5]	(2 <i>R</i> ,3 <i>aR</i> ,3 <i>bS</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>aS</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i> ,8 <i>R</i>)-3 <i>b</i> ,4,5,6,6 <i>a</i> -hexaclorodecahidro-2,5,7-meteno-3H-ciclopenta[<i>a</i>]pentalen-3-ona	

Tabla I.1.8 Identidad química de los organoclorados estudiados, (continuación).

Nombre común [n° CAS]	Nombre CAS	Estructura química
α-Clordano [5103-71-9]	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-1,2,4,5,6,7,8,8-octacloro-2,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexahidro-4,7-metano-1 <i>H</i> -indeno	
γ-Clordano [5566-34-7]	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-1,2,4,5,6,7,8,8-octacloro-2,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexahidro-4,7-metano-1 <i>H</i> -indeno	
4,4'-DDD [72-54-8]	1,1'-(2,2-dicloroetilideno)bis[4-clorobenceno]	
4,4'-DDE [72-55-9]	1,1'-(2,2-dicloroetenilideno)bis[4-clorobenceno]	
4,4'-DDT [50-29-3]	1,1'-(2,2,2-tricloroetilideno)bis[4-clorobenceno]	
Dieldrina [60-57-1]	(1 <i>aR</i> ,2 <i>R</i> ,2 <i>aS</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,6 <i>aR</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-3,4,5,6,9,9-hexacloro-1 <i>a</i> ,2,2 <i>a</i> ,3,6,6 <i>a</i> ,7,7 <i>a</i> -octahidro-2,7:3,6-dimetanonaft[2,3- <i>b</i>]oxireno	
α-Endosulfán [959-98-8]	(3 <i>α</i> ,5 <i>α</i> β,6 <i>α</i> ,9 <i>α</i> ,9 <i>α</i> β)-6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5 <i>a</i> ,6,9,9 <i>a</i> -hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido	
β-Endosulfán [33213-65-9]	(3 <i>α</i> ,5 <i>αα</i> ,6β,9β,9 <i>αα</i>)-6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5 <i>a</i> ,6,9,9 <i>a</i> -hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido	
Endrina [72-20-8]	(1 <i>aR</i> ,2 <i>R</i> ,2 <i>aR</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,6 <i>aS</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-3,4,5,6,9,9-hexacloro-1 <i>a</i> ,2,2 <i>a</i> ,3,6,6 <i>a</i> ,7,7 <i>a</i> -octahidro-2,7:3,6-dimetanonaft[2,3- <i>b</i>]oxireno	

Tabla I.1.8 Identidad química de los organoclorados estudiados, (continuación).

Nombre común [nº CAS]	Nombre CAS	Estructura química
Epóxido de heptacloro [1024-57-3]	(1 <i>aR</i> ,1 <i>bS</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,5 <i>aR</i> ,6 <i>S</i> ,6 <i>aR</i>)-2,3,4,5,6,7,7-heptacloro-1 <i>a</i> ,1 <i>b</i> ,5,5 <i>a</i> ,6,6 <i>a</i> -hexahidro-2,5-metano-2H-indeno[1,2- <i>b</i>]oxireno	
Heptacloro [76-44-8]	1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -tetrahydro-4,7-metano-1H-indeno	
α -Lindano [319-84-6]	(1 <i>α</i> ,2 <i>α</i> ,3 <i>β</i> ,4 <i>α</i> ,5 <i>β</i> ,6 <i>β</i>)-1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano	
β -Lindano [319-85-7]	(1 <i>α</i> ,2 <i>β</i> ,3 <i>α</i> ,4 <i>β</i> ,5 <i>α</i> ,6 <i>β</i>)-1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano	
γ -Lindano [58-89-9]	(1 <i>α</i> ,2 <i>α</i> ,3 <i>β</i> ,4 <i>α</i> ,5 <i>α</i> ,6 <i>β</i>)-1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano	
δ -Lindano [319-86-8]	(1 <i>α</i> ,2 <i>α</i> ,3 <i>α</i> ,4 <i>β</i> ,5 <i>α</i> ,6 <i>β</i>)-1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano	
Metoxicloro [72-43-5]	1,1'-(2,2,2-tricloroetilideno)bis[4-metoxibenceno]	
Sulfato de endosulfán [1031-07-8]	6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5 <i>a</i> ,6,9,9 <i>a</i> -hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3,3-dióxido	

1.6.3 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La mayoría de los pesticidas organoclorados son **extremadamente estables**, presentan una baja solubilidad en agua y una elevada solubilidad en medios orgánicos. alguna de estas propiedades es la base de su peligrosidad, y es que su **persistencia** en el medioambiente y su potencial de **bioacumulación** en tejidos animales y humanos a través de la cadena alimentaria influyen de manera importante en los riesgos asociados con estos pesticidas. Algunas de las **propiedades físico-químicas** de los organoclorados estudiados se resumen en la Tabla I.1.9.

Tabla I.1.9 Propiedades físico-químicas de los organoclorados estudiados [38-45].

Pesticida	Presión de vapor mmHg (25 °C)	Coefficiente de partición log K _{ow}	Solubilidad en agua mg L ⁻¹ (25 °C)
Aldehído de endrina	2,0·10 ⁻⁷	3,146-5,6	50
Aldrina	1,2·10 ⁻⁴	6,50	0,011 (20 °C)
Cetona de endrina	-	4,99	-
α-Clordano	2,2·10 ⁻⁵	5,54 ^a	0,056 ^b
γ-Clordano	2,9·10 ⁻⁵		
4,4'-DDD	1,35·10 ⁻⁶	6,02	0,090
4,4'-DDE	6,0·10 ⁻⁶	6,51	0,12
4,4'-DDT	1,60·10 ⁻⁷ (20 °C)	6,91	0,025
Dieldrina	5,89·10 ⁻⁶	6,20	0,110 (20 °C)
Endosulfán I	1·10 ⁻⁵	3,83	0,53
Endosulfán II	1·10 ⁻⁵	3,52	0,28
Endrina	2,0·10 ⁻⁷	5,34-5,6	0,2
Epóxido de heptacloro	1,95·10 ⁻⁵ (30 °C)	5,40	0,275
Heptacloro	3·10 ⁻⁴	6,10	0,05
α-Lindano	4,5·10 ⁻⁵	3,8	10
β-Lindano	3,6·10 ⁻⁷ (20 °C)	3,78	5
γ-Lindano	4,2·10 ⁻⁵ (20 °C)	3,72	17
δ-Lindano	3,5·10 ⁻⁵	4,14	10
Metoxicloro	1,4·10 ⁻⁶	4,68-5,08	0,045
Sulfato de endosulfán	1·10 ⁻⁵	3,66	0,117-0,22

^aestimado para clordano puro

^bpara α:γ (75:25)

1.6.4 USOS

Las **aplicaciones** de los principales pesticidas organoclorados se resumen a continuación.

DDT y derivados: Durante la 2ª Guerra Mundial fue muy utilizado para el control de la malaria, el tifus y otras **enfermedades** transmitidas por insectos. Además, se ha usado ampliamente en la **agricultura** para el control de insectos como la larva de la polilla del algodón, la polilla del manzano, el escarabajo de la patata o el piral del maíz (Figura I.1.7).



Figura I.1.7 Piral del maíz.

También se ha empleado extensivamente para erradicar plagas en bosques, como la oruga de la encina, y en el **ámbito doméstico** para el control de polillas y piojos. Tal y como ya se ha comentado, actualmente, el uso del DDT está restringido al control de ciertas enfermedades como la malaria. El 4,4'-DDD también se utilizó como pesticida, mientras que el DDE no tiene uso comercial. [40]

Metoxicloro: debido a su baja toxicidad en animales y humanos, el metoxicloro se ha erigido como un atractivo **sustituto del DDT**. Está registrado como insecticida contra un amplio rango de plagas, incluyendo moscas domésticas y mosquitos, cucarachas, ácaros rojos, y varios artrópodos habituales en campos de cultivo, hortalizas, frutas, cereales almacenados, ganados y mascotas. La EPA ha aprobado su uso como **pesticida y fumigante** en más de 85 cultivos. Además, el metoxicloro se puede aplicar para el control de larvas de moscas y mosquitos en áreas de gran tamaño como playas, estuarios, lagos y pantanos. [45]

Ciclodienos (clordano, aldrina, dieldrina, heptacloro, endosulfán): En su momento, el **clordano** se utilizó abundantemente como pesticida para el control de insectos en varios tipos de **cultivos agrícolas** (maíz, cítricos, etc.) y vegetación (césped, plantas ornamentales, etc.). Entre 1983 y 1988, ya sólo estaba permitido su uso para el control subterráneo de **termitas**. En un principio, la **aldrina** y la **dieldrina**

se usaban para el control de termitas, de plagas del maíz y en la industria de los cítricos. Además también se utilizaron para la **conservación de la madera**, entre otras aplicaciones. Por otro lado, el **heptacloro** se utilizó ampliamente en el **tratamiento de suelos y semillas** para proteger el maíz, los cereales y el sorgo del ataque de ciertas plagas. Así, se empleó para el control de hormigas, larvas de polillas, gusanos, termitas, arañuelas, gorgojos, etc. tanto en suelos cultivados como no cultivados. Actualmente, como ya se ha explicado, la producción y uso de clordano, aldrina, dieldrina y heptacloro están **prohibidos o restringidos** a determinadas exenciones. En lo que respecta al **endosulfán**, es particularmente efectivo contra el escarabajo de la patata, la polilla del melocotonero, el gusano de la col, el chinche *lygus*, el saltahoja y varios áfidos. Se aplica en diversos cultivos como té, hortalizas, nogales y árboles frutales de hoja caduca, tabaco o algodón. [38, 39, 42, 43]

γ-Lindano: durante muchos años desde su registro (en 1940) se aprobó su uso en una gran variedad de frutas y hortalizas, tabaco, verduras y plantas ornamentales de invernadero, bosques, establos de animales, etc. Actualmente, salvo aplicaciones muy concretas, su uso está prohibido. [44]

1.6.5 TOXICIDAD

La **toxicidad** de los principales insecticidas organoclorados se resume a continuación.

DDT y derivados: El DDT es un compuesto **muy tóxico**. La exposición a altas dosis puede afectar al sistema nervioso central y, en casos de envenenamiento moderadamente severos, puede provocar fallos cardíacos y respiratorios. El DDT se degrada a DDE y DDD y, con el tiempo, la relación DDT/metabolitos decrece.

Metoxicloro: Su estructura química y propiedades son similares a las del DDT, pero se biodegrada con más facilidad. Los organismos acuáticos lo **metabolizan** y lo transforman en sustancias menos tóxicas y, por tanto, no conduce a fenómenos significativos de bioacumulación.

Ciclodienos (clordano, aldrina, dieldrina, heptacloro, endosulfán): Estos compuestos afectan al **sistema nervioso central** causando temblores, convulsiones, y desmayos, dependiendo de la velocidad y duración de la exposición.

γ -Lindano: Exposiciones a corto plazo interfieren en la transmisión de impulsos nerviosos, mientras que exposiciones a largo plazo provocan daños en hígado y riñones. [2]

1.6.6 DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE

Debido a su elevada **estabilidad**, los pesticidas organoclorados pueden permanecer inalterables en el medioambiente durante largos períodos de tiempo. Así, a pesar de las estrictas restricciones en el uso de estos compuestos, muchos de ellos han sido **detectados** recientemente en un amplio rango de compartimentos medioambientales, incluso en regiones alejadas del lugar de aplicación original [46-50]. Seguidamente se amplían con más detalle ciertos aspectos de la **distribución en el medioambiente** de los principales pesticidas organoclorados.

DDT y derivados: Tanto el DDT como sus metabolitos son muy **persistentes** y, por lo tanto, tienden a **bioacumularse** en el medioambiente. El DDT puede llegar a la **atmósfera** como consecuencia de las operaciones de pulverización en aquellos lugares del mundo en los que todavía se utiliza. Aunque el DDT y sus metabolitos también pueden entrar en la atmósfera como consecuencia de la **volatilización** de residuos presentes en suelos y aguas superficiales, la mayor parte de los cuales son resultado de su uso en el pasado. A su vez, estos compuestos se depositan en el suelo y en aguas superficiales como consecuencia de la **deposición seca y húmeda** desde la atmósfera. Este proceso de volatilización y posterior deposición se puede repetir muchas veces, lo que lleva a que se produzca lo que se conoce como **destilación global** desde áreas templadas hacia regiones polares frías. Debido a esto, el DDT y sus metabolitos se han transportado a regiones Árticas y Antárticas en donde han sido detectados en el aire, en sedimentos y en nieve, y también se ha observado su acumulación en la biota. Además de la volatilización, otro proceso dominante en el medioambiente acuático es la **adsorción** a la biota, a la materia particulada en suspensión y a sedimentos. Cuando se depositan en el **suelo**, DDT, DDE y DDD

también se **adsorben fuertemente**. Por otro lado, la **degradación** del DDT tanto en el suelo como en aguas superficiales tiene lugar a través de procesos de **biotransformación** y **fotólisis**. [40]

Metoxicloro: En el **aire**, el **metoxicloro** existe tanto en fase particulada como, en menor medida, en fase vapor. Puede reaccionar fotoquímicamente con radicales hidroxilo del aire, pero es más probable que abandone la atmósfera a través de procesos de **deposición húmeda** y **seca**. En **agua**, este pesticida se asocia preferentemente a sedimentos y materia particulada, aunque una parte también puede estar disuelta en agua. Por otro lado, este pesticida se **bioconcentra** en un elevado número de organismos acuáticos, pero no en mamíferos debido a que en éstos se metaboliza y elimina con rapidez. Tanto en agua como en sedimentos, el metoxicloro se puede **degradar** por procesos químicos, fotoquímicos y biológicos. Se enlaza con fuerza a los **suelos**, pero no se suele detectar en este compartimento quizás en parte debido a que el viento y la lluvia pueden provocar la migración de partículas que contienen dicho pesticida. [45]

Ciclodienos: La **aldrina** se convierte fácilmente a dieldrina (p.ej a través de procesos de **fotodegradación**), que es ubicuo en el medioambiente. La dieldrina persiste porque es más resistente a la biotransformación y a la degradación abiótica que la aldrina. La dieldrina se **bioconcentra** y **biomagnifica** a través de las cadenas tróficas acuáticas y terrestres. El transporte de la aldrina y la dieldrina en **suelos** es mínimo ya que ambos compuestos se adhieren fuertemente al suelo. No obstante, su **volatilización** desde suelos húmedos es bastante probable. La mayor parte de la aldrina y la dieldrina que se encuentra en **aguas superficiales** es resultado de la **escorrentía** desde suelos contaminados. El **clordano** es extremadamente **persistente** en el medioambiente y en algunos suelos puede permanecer más de 20 años. La **volatilización** quizás sea el principal mecanismo de eliminación desde el **suelo**. Por otro lado, la **adsorción** a sedimentos y la **volatilización** son los procesos más importantes en **agua**. En **aire**, el clordano existe predominantemente en **fase vapor**. El clordano en fase gas se puede degradar mediante **fotólisis** y reacciones con radicales hidroxilo, además, puede transportarse largas distancias y experimentar **deposición húmeda o seca**. Otro aspecto a tener en cuenta es su elevado factor de **bioconcentración**. El **heptacloro** se degrada a **epóxido de heptacloro** y a otros

productos en el medioambiente. El epóxido de heptacloro se degrada más lentamente y, en consecuencia, es más **persistente** que el heptacloro. Ambos compuestos se **adsorben** fuertemente a sedimentos y también se **bioconcentran** en organismos tanto acuáticos como terrestres. Además, su **biomagnificación** en cadenas tróficas es significativa. Finalmente, el **endosulfán** se reparte principalmente entre la atmósfera y los suelos y sedimentos. Se puede **desplazar** largas distancias en la **atmósfera**, pero es relativamente **inmóvil** en **suelos**. Es susceptible de experimentar **degradación** por **hidrólisis** y también por acción de **microorganismos**. A diferencia de otros organoclorados, no se biomagnifica en las cadenas alimentarias. [38, 39, 42, 43]

Lindano: Una vez liberado al medioambiente, el **lindano** se puede distribuir entre todos los compartimentos medioambientales. A pesar de que su tiempo de vida atmosférico es largo, el lindano se puede degradar por **reacción con radicales hidroxilo** o puede ser eliminado del aire por **deposición húmeda y seca**. Se cree que la **biodegradación** es el proceso de descomposición dominante tanto en **suelo** como en **agua**, aunque la **hidrólisis** y la **fotólisis** también pueden tener lugar en menor medida. [44]

1.7 OTROS PESTICIDAS

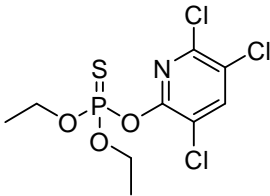
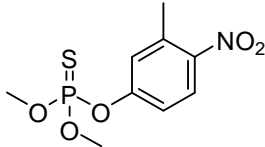
1.7.1 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

La diversidad de los insecticidas organofosforados los convierte en el grupo de insecticidas más **versátil** [2]. Estos compuestos han sido ampliamente utilizados en la agricultura durante los últimos 40 años. Hay unos 200 organofosforados diferentes en el mercado y suponen un 45% de los pesticidas registrados en EE.UU. Además, el uso de este tipo de pesticidas está favorecido por su habilidad para degradarse con facilidad en el medioambiente [51].

1. PESTICIDAS

Los insecticidas organofosforados son habitualmente ésteres, amidas, o tioles derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico, fosforotioico, o fosfonotioico. En la Tabla I.1.10 se muestran las **estructuras** de los organofosforados estudiados en esta Tesis, así como sus nombres comunes, números y nombres CAS.

Tabla I.1.10 Identidad química de los organofosforados estudiados.

Compuesto [nº CAS]	Nombre CAS	Estructura
Clorpirifos [2921-88-2]	O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) éster del ácido fosforotioico	
Fenitrothion [122-14-5]	O,O-dimetil-O-(3-metil-4-nitrofenil) éster del ácido fosforotioico	

La mayoría de los pesticidas organofosforados son ligeramente solubles en agua, tienen K_{ow} elevados y bajas presiones de vapor. Las **propiedades físico-químicas** de los organofosforados estudiados se resumen en la Tabla I.1.11. [51, 52]

Tabla I.1.11 Propiedades físico-químicas de los organofosforados estudiados [51, 52].

Pesticida	Presión de vapor mPa (20-25 °C)	Coefficiente de partición log K_{ow}	Solubilidad en agua mg L ⁻¹ (20-25 °C)
Fenitrothion	0,676	3,32	19
Clorpirifos	2,7	4,96	1,4

En lo que respecta a sus **aplicaciones**, el **clorpirifos** es, además de insecticida, acaricida y nematocida. Se utiliza en el control de plagas de insectos de suelo y follaje en una gran variedad de cultivos pero, fundamentalmente, en cultivos de maíz [53]. Por su parte, el **fenitrothion** es un insecticida y acaricida. Se utiliza en invernaderos y en plantas ornamentales exteriores, incluyendo árboles, para controlar una gran

variedad de insectos y ácaros. También se comercializa para el control de hormigas y cucarachas en hogares, tiendas, restaurantes, almacenes, etc. [54].

El mecanismo de **acción tóxica** de los organofosforados es el mismo en insectos que en mamíferos. En ambos casos, estos pesticidas inactivan la enzima **acetilcolinesterasa** (AChE) afectando, por lo tanto, a la transmisión de impulsos nerviosos. Así, en mamíferos, algunos de los síntomas por envenenamiento con organofosforados son debilidad o parálisis muscular [55].

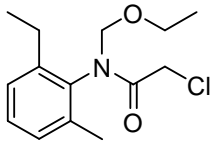
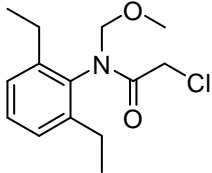
En cuanto a su **distribución en el medioambiente**, la movilidad del **clorpirifos** en el suelo es limitada y no se ha observado su presencia en aguas subterráneas. Por otro lado, tiene una presión de vapor intermedia por lo que, bajo determinadas condiciones, la **volatilización** puede ser un mecanismo importante de disipación. En cuanto a los procesos de su degradación, éstos pueden ser tanto abióticos como bióticos [56]. En lo que respecta al **fenitrotion**, éste llega al aire a través de su volatilización desde superficies contaminadas y se puede desplazar del lugar de aplicación durante su pulverización. Se filtra lentamente en la mayoría de los suelos, pero también se puede desplazar por escorrentía. Se degrada tanto por **fotólisis** como por **hidrólisis**. Además, en agua, la presencia de microflora también acelera su degradación y, en suelo, la **biodegradación** es la principal ruta de degradación. [57]

1.7.2 HERBICIDAS AMIDA

El uso extendido de **herbicidas amida** ha contribuido de manera importante al incremento de la producción agrícola. Sin embargo, sus residuos también suponen cierto riesgo desde el punto de vista de la contaminación del medioambiente.

Una gran variedad de compuestos forma parte de este grupo de herbicidas, que siguen la siguiente fórmula general: **R₁-CO-N-(R₂,R₃)**. Los componentes principales de este grupo son las cloroacetamidas N-sustituidas y las anilidas sustituidas. Tanto el **acetocloro** como el **alacloro** pertenecen al grupo de las anilidas, más concretamente al de las **cloroacetanilidas**. Sus números y nombres CAS, así como sus **estructuras** se muestran en la Tabla I.1.12. [2]

Tabla I.1.12 Identidad química de los herbicidas cloroacetanilida estudiados.

Compuesto [nº CAS]	Nombre CAS	Estructura
Acetocloro [34256-82-1]	2-cloro-N-(etoximetil)-N-(2-etil-6-metilfenil)acetamida	
Alacloro [15972-60-8]	2-cloro-N-(2,6-dietilfenil)-N-(metoximetil)acetamida	

Algunas de las **propiedades físico-químicas** de los herbicidas estudiados se han incluido en la Tabla I.1.13 [2].

Tabla I.1.13 Propiedades físico-químicas de los herbicidas cloroacetanilida estudiados [2].

Pesticida	Presión de vapor mPa (25 °C)	Coefficiente de partición log K _{ow}	Solubilidad en agua mg L ⁻¹
Acetocloro	0,005	4,14	223 (25 °C)
Alacloro	2,0	3,09	170 (20 °C)

Las cloroacetanilidas se utilizan para el control de **malas hierbas** en varios cultivos. El **alacloro** se usa especialmente en cultivos de maíz, sorgo y semilla de soja [58]. Por otra parte, el **acetocloro** se emplea sobre todo en cultivos de maíz, aunque también de col, cítricos, café, algodón, etc. [59].

Tanto el **alacloro** como el **acetocloro** han sido clasificados por la EPA como **carcinógenos del grupo B2** (probable carcinógeno en humanos) [60, 61]. Además, se ha comprobado que el acetocloro es un **disruptor endocrino** potente [62]. Por otro lado, se ha observado que el alacloro posee **genotoxicidad** y también se sospecha que pueda afectar al sistema hormonal [63].

En lo que se refiere a su **distribución en el medioambiente**, el **alacloro** se puede degradar en el **suelo** por acción de bacterias o de la luz solar. Además, no se adsorbe con fuerza a la mayoría de los suelos por lo que se puede **volatilizar** o **filtrar** hacia aguas subterráneas. La **biodegradación** y la **fotodegradación** también son procesos importantes en **aguas superficiales**, pero no así la volatilización. En cuanto a la bioconcentración, no es un proceso fundamental para el alacloro, ya que se elimina tan pronto es absorbido por plantas o animales [58]. El **acetocloro** también posee bajos coeficientes de adsorción, por lo que es bastante móvil en el **suelo** y, por tanto, supone un peligro potencial para el medioambiente acuático [64]. De hecho, varios estudios han demostrado la presencia de este herbicida en **aguas superficiales** y **subterráneas** [65, 66]. Además, el acetocloro no es demasiado susceptible a volatilizarse y la fotodegradación tampoco parece ser una ruta importante de degradación de este pesticida [67]. Sin embargo, sí que se han publicado trabajos acerca de metabolitos generados como consecuencia de procesos de su **biodegradación** [68].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] U.S. Environmental Protection Agency. *What is a Pesticide?* <<http://www.epa.gov/pesticides/>> (Consulta: 10-05-09).
- [2] Tadeo, J.L.; Sánchez-Brunete, C.; González, L. *Pesticides: Classification and Properties*. En *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*; Tadeo, J.L. Ed.; CRC Press, **2008**; 1-34.
- [3] ECPA Review 2005-2006, European Crop Protection Association.
- [4] ECPA Review 2001-2002, European Crop Protection Association.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)*. <<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/pm/jmpr/en/>> (Consulta: 10-05-09).
- [6] Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR). *Pesticide Residues in Food, Maximum Residue Limits*. <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp> (Consulta: 10-05-09).

- [7] Council Directive 96/23/EC of 29 abril 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, *Off. J. Eur. Comm.*, Nº L125/10, 23 May 1996.
- [8] Regulation (EC) Nº 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- [9] Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed, *Off. J. Eur. Comm.*, Nº L140/10, 30 May 2002.
- [10] Commission Regulation (EC) Nº 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) Nº 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV setting maximum residue levels of pesticides in or on certain products.
- [11] European Commission. Soil Protection (2007) *A strategy to keep Europe's soils robust and healthy*. <<http://ec.europa.eu/environment/soil/index.htm>> (Consulta: 10-05-09).
- [12] Ministerio de la Presidencia de España (2005) Real Decreto 9/2005, *Boletín Oficial del Estado* 15/2005, 1833-1843.
- [13] Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2003**.
- [14] Khambay, B. Pyrethroid Insecticides. *Pestic. Outlook* **2002**, 13, 49-54.
- [15] Soderlund, D.M.; Clark, J.M.; Sheets, L.P.; Mullin, L.S.; Piccirillo, V.J.; Sargent, D.; Stevens, J.T.; Weiner, M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* **2002**, 171, 3-59.
- [16] Mueller-Beilschmidt, D. The toxicology and environmental fate of synthetic pyrethroids. *J. Pestic. Reform*. **1990**, 10, 32-38.
- [17] Bloomquist, J.R. *Insecticides: Chemistries and Characteristics*. University of Minnesota, **1999**. <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>> (Consulta: 10-05-09)
- [18] WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides: *d,d,trans-Cifenotrina*, World Health Organization (WHO), **2005**.

- [19] Control of shoot/foiar feeding pests with pesticide seed treatments, US patent 6713077, **2004**.
- [20] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V9.04 for Solaris (©1994-2009 ACD/Labs) para SciFinder® Scholar™ 2009.
- [21] Baygon®. *How the various groups of agents function in the Baygon products*. <http://www.baygon.com/nqcontent.cfm?a_id=420> (Consulta: 10-05-09).
- [22] Fabric protectant, US Patent 6024973, **2000**.
- [23] Evaluation on: transfluthrin use as a public hygiene insecticide, Advisory Committee on Pesticides, York, UK, **1997**.
- [24] Winslow; L. The effects of pyrethrins and pyrethroids on human physiology. *Human Physiology*, **2002**, June 7: 1-12.
- [25] Safety of Pyrethroids for Public Health Use, World Health Organization (WHO) Communicable Disease Control, Prevention and Eradication, WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) & Protection of the Human Environment Programme on Chemical Safety (PCS), **2005**.
- [26] Kim, S.S.; Lee, R.D.; Lim, K.J.; Kwack, S.J.; Rhee, G.S.; Seok, J.H.; Lee, G.S.; An, B.S.; Jeung, E.B.; Park, K.L. Potential estrogenic and antiandrogenic effects of permethrin in rats. *J. Reprod. Develop.* **2005**, 51, 201-210.
- [27] Tyler, C.R.; Beresford, N.; Van der Woning, M.; Sumpter, J.P.; Thorpe, K. Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, 19, 801-809.
- [28] Safety Source for Pest Management, Beyond Pesticides Least Toxic Service Directory. *Pyrethroids/Pyrethrins*. <<http://www.beyondpesticides.org/info/services/pesticidefactsheets/toxic/pyrethroid.htm>> (Consulta: 10-05-09)
- [29] McCarthy, A.R.; Thomson, B.M.; Shaw, I.C.; Abell, A.D. Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *J. Environ. Monit.* **2006**, 8, 197-202.
- [30] European Parliament legislative resolution of 13 January 2009 on the Council common position for adopting a directive of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action to achieve a sustainable use of pesticides.
- [31] Casida, J.E. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ. Health Persp.* **1980**, 34, 189-202.

- [32] Piperonyl butoxide (General Fact Sheet), National Pesticide Telecommunications Network, Oregon, **2000**.
- [33] Piperonyl butoxide (062), JMPR: Evaluations of Pesticide Residues, FAO Pesticide Management, FAO Pesticides for Plant Protection Products, **2001**.
- [34] Iwata, H.; Tanabe, S.; Sakai, N.; Nishiraura, A.; Tatsakawa, R. Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water and sediments from Asia and Oceania and their implications for global redistribution from lower latitudes. *Environ. Poll.* **1994**, 85, 15-33.
- [35] Guruge, K.S.; Tanabe, S. Contamination by persistent organochlorines and butyltin compounds in the west coast of Sri Lanka. *Mar. Pollut. Bull.* **2001**, 42, 179-186.
- [36] Colborn, T.; Smolen, M.J. Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, 146, 91-172.
- [37] Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs). <<http://www.pops.int/>> (Consulta: 10-05-09)
- [38] Toxicological profile for Aldrin/Dieldrin, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2002**.
- [39] Toxicological profile for Chlordane, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **1994**.
- [40] Toxicological profile for DDT, DDE and DDD, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2002**.
- [41] Toxicological profile for Endrin, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **1996**.
- [42] Toxicological profile for Endosulfan, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2000**.
- [43] Toxicological profile for Heptachlor and Heptachlor Epoxide, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2007**.

- [44] Toxicological profile for Hexachlorocyclohexane, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2005**.
- [45] Toxicological profile for Methoxychlor, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2002**.
- [46] Shegunova, P.; Klánová, J.; Holoubek, I. Residues of organochlorinated pesticides in soils from the Czech Republic. *Environ. Pollut.* **2007**, 146, 257-261.
- [47] Peris, E.; Requena, S.; de la Guardia, M.; Pastor, A.; Carrasco, J.M. Organochlorinated pesticides in sediments from the Lake Albufera of Valencia (Spain). *Chemosphere* **2005**, 60, 1542-1549.
- [48] Poolpak, T.; Pokethitiyook, P.; Kruatrachue, M.; Arjarasirikoon, U.; Thanwaniwat, N. Residue analysis of organochlorine pesticides in the Mae Klong river of Central Thailand. *J. Hazard. Mater.* **2008**, 156, 230-239.
- [49] Wang, X.; Li, X.; Cheng, H.; Xu, X.; Zhuang, G.; Zhao, C. Organochlorine pesticides in particulate matter of Beijing, China. *J. Hazard. Mater.* **2008**, 155, 350-357.
- [50] Geisz, H.N.; Dickhut, R.M.; Cochran, M.A.; Fraser, W.R.; Ducklow, H.W. Melting glaciers: a probable source of DDT to the Antarctic marine ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 3958-3962.
- [51] Jeannot, R.; Dagnac, T. Organophosphorus compounds in water, soils, waste, and air. En *Chromatographic analysis of the environment*; Nollet, L.M.L. Ed.; CRC Press, **2006**; 841-888.
- [52] IUPAC Agrochemical Information, *Fenitrothion*. <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/299.htm>> (Consulta: 10-05-09)
- [53] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), *Chlorpyrifos Facts*. <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/factsheets/clorpirifos_fs.htm> (Consulta: 10-05-09).
- [54] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), *Fenitrothion Facts*. <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0445fact.pdf>> (Consulta: 10-05-09).
- [55] Kamrin, M.A. Organophosphates. En *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*, CRC Press, **1997**; 135-238.

- [56] Racke, K.D. Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1993**, 131, 1-150.
- [57] Fenitrothion in Drinking-water, Background for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, World Health Organization (WHO), **2004**.
- [58] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), *Consumer Factsheet on: Alachlor*. <http://www.epa.gov/ogwdw/contaminants/dw_contamfs/alachlor.html> (Consulta: 13-05-09).
- [59] Extension Toxicology Network (EXTOXNET), *Pesticide Information Profile: Acetochlor*. < <http://extoxnet.orst.edu/pips/acetochl.htm> > (Consulta: 13-05-09).
- [60] U.S. EPA, Pesticide Tolerances for Acetochlor. Federal Register. Vol. 59, Nº 56. Rules and Regulations, **1994**.
- [61] U.S. EPA, Pesticides in Groundwater Data Base: Interim Report. Office of Pesticide Programs, Washington, DC, **1988**.
- [62] Rollerova, E.; Gasparova, Z.; Wsolova, L.; Urbancikova, M. Interaction of acetochlor with estrogen receptor in the rat uterus: Acetochlor-possible endocrine modulator? *Gen. Physiol. Biophys.* **2000**, 19, 73-84.
- [63] Wilson, A.G.E.; Thake, D.C.; Heydens, W.E.; Brewster, D.W.; Hotz, K.J. Mode of action of thyroid tumor formation in the male Long-Evans rat administered high doses of alachlor. *Toxicol. Sci.* **1996**, 33, 16-23.
- [64] Lengyel, Z.; Földényi, R. Acetochlor as a soil pollutant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2003**, 10, 13-18.
- [65] Kolpin, D.W.; Goolsby, D.A. Acetochlor in the hydrologic system in the midwestern United States. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 459-464.
- [66] Visi, É.; Ambrus, Á.; Hargitai, É.; Károly, G.; Ferenczi, J.; Solymos, E.; Berczi, B. Monitoring the pesticide residues in surface water in Hungary. Presented at ETECI'98, Budapest, 4-6 May.
- [67] Weed Science Society of America. WSSA Herbicide Handbook; WSSA: Champaign, IL, **1994**.
- [68] Ye, C.M.; Wang, X.J.; Zheng, H.H. Biodegradation of acetanilide herbicides acetochlor and butachlor in soil. *J. Environ. Sci. (China)* **2002**, 14, 524-529.

CAPÍTULO I.2. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

2.1 INTRODUCCIÓN

La **Microextracción en Fase Sólida** (*Solid-Phase MicroExtraction*, **SPME**) es una técnica de preparación de muestra desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989 con el objetivo de satisfacer la necesidad de un método de preparación de muestra rápido, libre de disolventes y compatible con los trabajos de campo. La SPME se basa en la utilización de una **fibra** de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria ab/adsorbente de naturaleza polimérica. La fibra se **expone** a la muestra a analizar durante un tiempo determinado y, posteriormente, el analito extraído es **desorbido** de la fibra en el inyector de un cromatógrafo (habitualmente de gases). El mayor número de **aplicaciones** de esta técnica se enmarcan dentro del campo medioambiental, aunque también son numerosas las aplicaciones clínicas y alimentarias. Otro campo importante de aplicación es en el sector de los aromas y fragancias. [1]

La SPME presenta importantes **ventajas** en comparación con las técnicas de preparación de muestra tradicionales:

1. la **ausencia de disolventes orgánicos**, que hace que sea una técnica respetuosa con el medioambiente;
2. la **rapidez** de la técnica, lo que incrementa la capacidad de procesamiento de muestras;
3. las **reducidas dimensiones** del dispositivo requerido, lo que facilita su uso en trabajos de campo;
4. la **sensibilidad**, que es comparable a la de otras técnicas basadas en la extracción líquida. Como se verá más adelante, aunque sólo se extrae de la muestra una pequeña porción del analito, toda la cantidad extraída se transfiere al instrumento analítico. Esto contrasta con las técnicas de extracción líquidas, en donde la mayor parte del analito se transfiere de una

muestra dada a la fase orgánica, pero sólo una pequeña porción (1/100 o 1/1000) de la cantidad extraída se introduce en el instrumento analítico.

2.2 PRINCIPIOS BÁSICOS DE SPME

El transporte de los analitos desde la matriz analizada hasta el recubrimiento de la fibra comienza tan pronto como la fibra se pone en contacto con la muestra. Se considera que la SPME se ha completado cuando la concentración del analito ha alcanzado el **equilibrio** de distribución entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. En la práctica esto significa que, una vez que se ha alcanzado el equilibrio, la cantidad extraída permanece **constante** dentro de los límites del error experimental y es independiente de un incremento posterior del tiempo de extracción. Las condiciones de equilibrio se pueden describir mediante la ecuación I.2.1:

$$n = \frac{K_{fs}V_fV_sC_0}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (\text{ecuación I.2.1})$$

donde n es la cantidad de analito extraída por el recubrimiento, K_{fs} es el coeficiente de distribución entre la fibra y la muestra, V_f es el volumen del recubrimiento de la fibra, V_s es el volumen de muestra, y C_0 es la concentración inicial del analito considerado en la muestra analizada.

La ecuación I.2.1, que asume que la matriz de la muestra se puede considerar como una fase homogénea simple y que no hay espacio de cabeza en el sistema, se puede modificar si se tiene en cuenta la existencia de otros componentes en la matriz, considerando el volumen de las fases individuales y las constantes de distribución adecuadas.

La SPME es una **técnica de equilibrio** y por eso no extrae exhaustivamente. No obstante, de la ecuación I.2.1 se deduce que la concentración del analito en la muestra es directamente proporcional a la cantidad extraída, y ésta es la base de la **cuantificación**. [2]

2.3 DISPOSITIVO UTILIZADO

El dispositivo más empleado en SPME, introducido por **Supelco** en 1993, consiste en una **fibra** de sílice fundida (generalmente de 1 cm de longitud y 0,11 cm de diámetro interno), químicamente inerte, estable a altas temperaturas y recubierta de un polímero ab/adsorbente (el más utilizado es el polidimetilsiloxano —**PDMS**). La fibra utilizada en SPME se sitúa en el interior de una aguja de acero inoxidable. Esta aguja forma parte de una jeringa especialmente diseñada para alojar la fibra, cuyo esquema se muestra en la Figura I.2.1. [1]

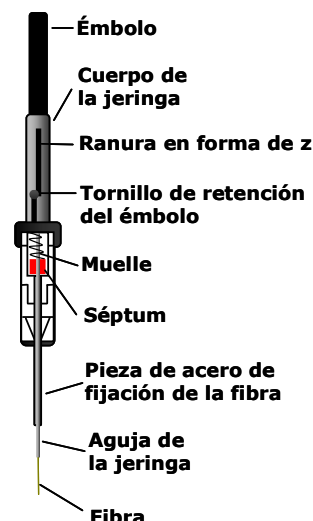


Figura I.2.1 Esquema del dispositivo de SPME [2].

2.4 DESARROLLO DEL MÉTODO

La Microextracción en Fase Sólida consta de **dos etapas** (Figura I.2.2): una etapa de extracción y otra de desorción. Ambas se explican a continuación.

- **Etapas de extracción o etapa de muestreo:** En un vial se sitúa la muestra líquida conteniendo analitos orgánicos o la muestra sólida conteniendo compuestos orgánicos volátiles y, a continuación, el vial se cierra con un septum y con una cápsula. La aguja de la jeringa, con la fibra en su interior, perfora el septum. Empujando a continuación el émbolo, se pone la fibra en contacto con la muestra o con el espacio de cabeza existente sobre ésta. Los compuestos orgánicos de la muestra son ab/adsorbidos en la fibra, produciéndose el reparto de los analitos entre la muestra y el recubrimiento polimérico de la fibra. Después de un tiempo predeterminado, la fibra se retrae e introduce nuevamente en la aguja, retirándose la jeringa del vial de muestreo.
- **Etapas de desorción:** Inmediatamente después, la jeringa se introduce en el inyector de un instrumento analítico (cromatógrafo de gases—GC— o un equipo de cromatografía líquida de alta resolución —HPLC), donde los analitos

son desorbidos térmicamente o por disolución en la fase móvil, según la técnica instrumental empleada.

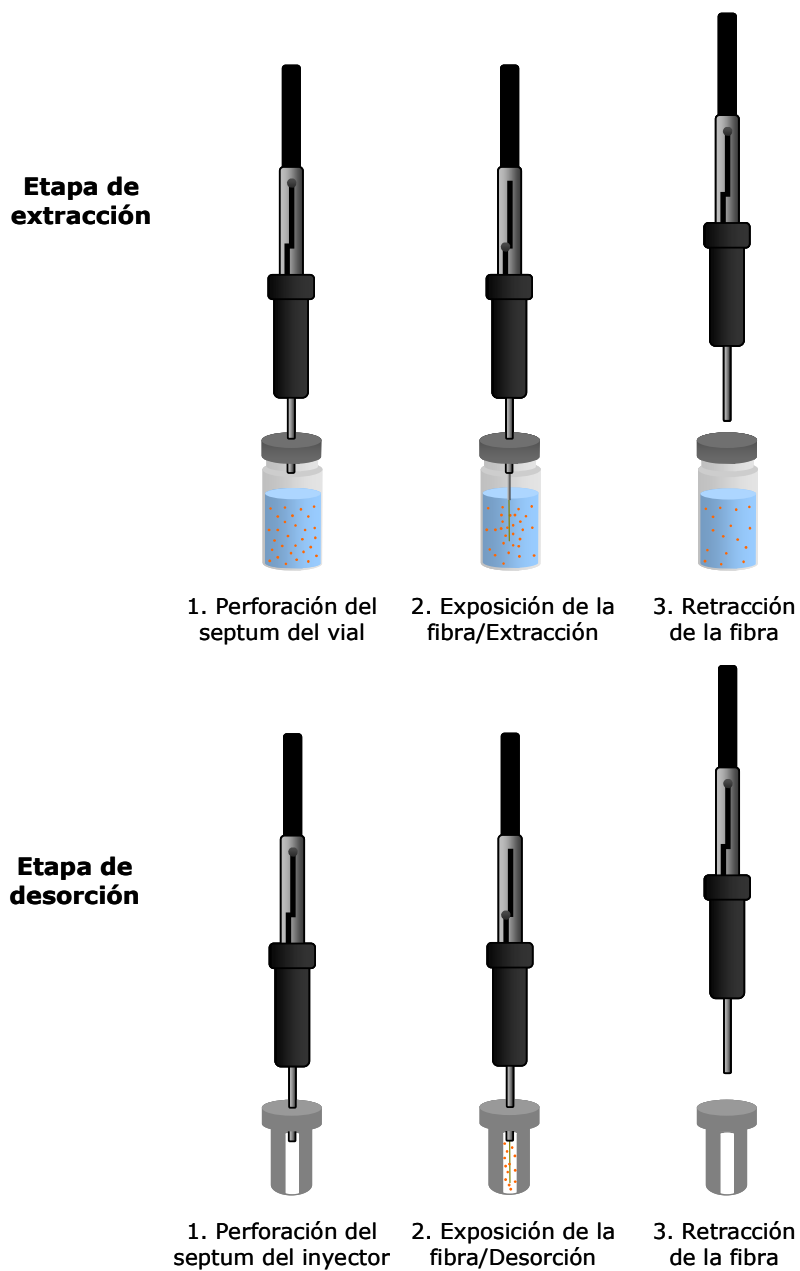


Figura I.2.2 Etapas de la SPME.

En cuanto a los **modos de extracción**, existen dos tipos básicos de Microextracción en Fase Sólida (Figura I.2.3):

- **Extracción directa (DSPME):** la fibra se introduce directamente en la muestra y los analitos son transportados directamente desde la matriz de la muestra a la fase extractante.
- **Extracción en espacio de cabeza (HSSPME):** la fibra se expone al espacio de cabeza existente sobre la muestra. Los analitos han de ser transportados en una primera etapa desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza, antes de que sean ab/adsorbidos en la fibra. [1]

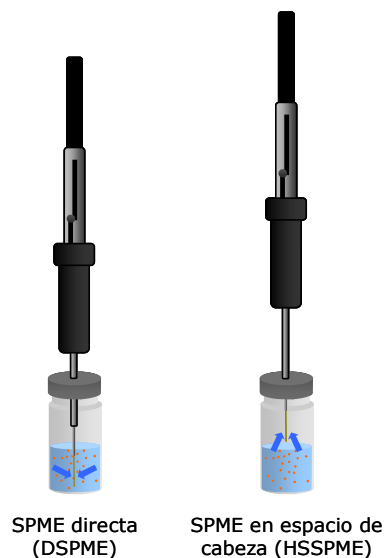


Figura I.2.3 Modos de extracción en SPME.

2.5 PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA EFICACIA DE LA EXTRACCIÓN

2.5.1 FASE EXTRACTANTE: RECUBRIMIENTO

Actualmente se dispone de varios tipos de fases poliméricas comerciales. La afinidad de la fibra por un analito en particular depende del principio “**semejante disuelve a semejante**”, aunque hay otras variables importantes como el espesor de la fase [3]. El **espesor de la fase** determina la sensibilidad del método; claro que, al utilizar fibras con mayor espesor, la cinética del proceso es más lenta y resultan tiempos de extracción mayores [1]. En la Tabla I.2.1 se incluyen las fibras de SPME más habituales de las comercializadas por **Supelco**, junto con algunas de sus propiedades y aplicaciones generales.

Tabla 1.2.1 Propiedades y aplicaciones generales de las principales fibras comercializadas por Supelco [4].

Fase polimérica	Espesor	Temperatura máxima	Polaridad	Tipo	Aplicaciones
PDMS	100 µm	280 °C	apolar	no enlazada	compuestos volátiles o de bajo peso molecular
	30 µm	280 °C	apolar	no enlazada	compuestos apolares semivolátiles
	7 µm	340 °C	apolar	enlazada	compuestos apolares de bajo peso molecular
PA	85 µm	320 °C	polar	parcialmente entrelazada	compuestos polares en muestras polares
PDMS/DVB	65 µm	270 °C	semipolar	parcialmente entrelazada	compuestos polares volátiles
CAR/PDMS	75 µm	320 °C	semipolar	parcialmente entrelazada	compuestos volátiles
CW/DVB	70 µm	250 °C	polar	parcialmente entrelazada	compuestos polares
DVB/CAR/PDMS	50/30 µm	270 °C	semipolar	altamente entrelazada	compuestos de 3-20 átomos de carbono

2.5.2 TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Puesto que la SPME es una técnica de equilibrio, la máxima cantidad de analito será extraída una vez transcurrido el tiempo necesario para alcanzar dicho **equilibrio**. Los compuestos con bajas constantes de distribución necesitan más tiempo para alcanzar el equilibrio, por eso en estos casos se suelen seleccionar **tiempos más cortos** que los de equilibrio. Cuando esto ocurre, el tiempo de exposición de la fibra requiere un control estricto para así obtener suficiente reproducibilidad. [3]

2.5.3 TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN

En SPME, la temperatura de extracción tiene dos efectos contrapuestos. Por una parte, el incremento de temperatura durante la extracción favorece la **difusión** de los analitos hacia la fibra. Además, en HSSPME, la temperatura facilita la transferencia de los analitos hacia el **espacio de cabeza**. Por otro lado, puesto que la etapa de

absorción es un proceso **exotérmico**, un incremento de temperatura reduce la constante de distribución fibra/muestra (K_{fs}) de los analitos. [2]

2.5.4 EFECTO SALINO

La adición de sales (NaCl , KCl , Na_2SO_4) a muestras acuosas provoca un incremento de la **fuerza iónica** de la disolución de la muestra, tendiendo las moléculas de agua a solvatar a los iones presentes en la muestra y no a las moléculas neutras de los analitos. Se produce, por tanto, una **disminución de la solubilidad** de los analitos en agua, forzando su paso a otras fases del sistema, espacio de cabeza y fibra, originando un incremento de sensibilidad. Para que este proceso tenga lugar es necesario que los analitos se encuentren en forma **no disociada**, de lo contrario el efecto sería el opuesto y disminuiría la cantidad de analito ab/adsorbida por la fibra. [1]

2.5.5 MODIFICACIÓN DEL PH

El pH de la muestra afecta al equilibrio de disociación de los analitos en medio acuoso. Obviamente, la extracción es más eficaz si los analitos están **sin disociar**. Por ejemplo, cuando el pH disminuye, se produce un aumento de la concentración del ácido en su forma no disociada, resultando un aumento de la cantidad extraída por la fibra y, por tanto, un incremento de la sensibilidad. Para obtener la máxima sensibilidad, se debe trabajar a un pH al menos **dos unidades por debajo** (especies ácidas) o **por encima** (especies básicas) del correspondiente pK_a .

En la práctica, en las extracciones afectadas por el pH, las muestras deben **tamponarse** para conseguir buena reproducibilidad. Cuando se trabaja con muestras que están a pH extremos, se recomienda recurrir al espacio de cabeza (HSSPME) para evitar el deterioro de la fibra. [1]

2.5.6 ADICIÓN DE DISOLVENTE

La adición de disolvente orgánico a **muestras acuosas** reduce habitualmente la cantidad de analito extraído [5-6]. Por otra parte, la adición de agua o de disolventes orgánicos a **muestras de suelos y lodos** ha demostrado ser muy eficaz para facilitar

la liberación de los analitos desde la matriz y mejorar su difusión hacia la fase estacionaria de la fibra [2].

2.5.7 AGITACIÓN DE LA MUESTRA Y FORMA DEL VIAL

La agitación de la muestra **favorece la difusión** de los analitos hacia la fase de la fibra y reduce el tiempo de extracción tanto en DSPME como en HSPME [3]. Sin embargo, cuando se analizan compuestos muy volátiles mediante HSPME, la mayoría de los analitos se encuentran en el espacio de cabeza dando lugar a extracciones rápidas incluso cuando el sistema no se agita. Obviamente, cuando se analizan especies menos volátiles la agitación facilita la transferencia de masa entre la muestra y el espacio de cabeza dando lugar a **extracciones más rápidas**. [1]

La forma del vial también afecta a la cinética del proceso de extracción. En HSPME estática, la transferencia de masa entre la muestra y el espacio de cabeza está afectada por el tamaño de la **superficie de contacto** entre las dos fases. Asimismo, dependiendo de la forma del vial, se producirá más o menos **convección** cuando se agita la muestra. [1]

2.5.8 VOLUMEN DE MUESTRA Y DEL ESPACIO DE CABEZA

El volumen de muestra es un parámetro importante a optimizar en la SPME puesto que está directamente relacionado con la sensibilidad del método (ver ecuación I.2.1) [3]. El volumen de muestra se debe seleccionar en función del coeficiente de distribución K_{fs} . Tal y como se deduce de la ecuación I.2.1, la sensibilidad depende del volumen de la muestra si el coeficiente de distribución del analito es muy alto. Así, se debe trabajar con un volumen de muestra elevado (10 mL) cuando se extraen compuestos con K_{fs} altos. Además, en estos casos se deben usar recubrimientos de poco espesor para reducir el tiempo de equilibrio. [6]

En **HSPME**, los analitos se distribuyen entre la matriz de la muestra, la fibra, y el espacio de cabeza. Los compuestos muy volátiles se aglutinan en el espacio de cabeza, y su volumen debe ser pequeño para así concentrar los analitos antes de su difusión

hacia la fase de la fibra. Si el volumen del espacio de cabeza es demasiado grande, la sensibilidad se reduce considerablemente. [7]

El volumen del espacio de cabeza también afecta a la **cinética** del proceso. Cuanto más pequeño sea éste con relación al volumen de muestra, más rápido será el transporte de los analitos desde la muestra a la fibra. [1]

2.6 APLICACIONES DE LA SPME AL ANÁLISIS DE PESTICIDAS

2.6.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA

La mayoría de las aplicaciones de la SPME para la determinación de pesticidas se centran en el análisis de muestras de agua, no solo por la relevancia ambiental de las mismas, sino también porque esta técnica de extracción se ajusta a la perfección a este tipo de matrices. Así, la SPME ha sido el método seleccionado para la determinación de una gran variedad de pesticidas en **agua ultrapura** [8], **aguas superficiales** [9-14], **aguas residuales** [6, 10, 13] y muestras de **agua potable** [15].

2.6.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUELO

En muchas de las aplicaciones de la SPME al análisis de pesticidas en suelos, las muestras se mezclan con agua destilada y, a continuación, se lleva a cabo la **inmersión** de la fibra de SPME en la **suspensión** resultante [16, 17]. En estos casos se deben tener en cuenta los **efectos negativos** de la matriz del suelo, tanto sobre la eficacia de la SPME como sobre la resolución cromatográfica.

Por otro lado, también existen estudios en los que se ha utilizado la SPME sobre **extractos orgánicos** de suelo obtenidos de la aplicación de técnicas de extracción sólido-líquido como la extracción asistida por microondas (MAE) [18, 19], la extracción por ultrasonidos (USE) [20] o la extracción micelar asistida por microondas (MAME) [21].

Aunque la mayoría de los métodos publicados se basan en la inmersión directa de la fibra en el extracto de la muestra o en una suspensión, también se han desarrollado procedimientos que permiten la cuantificación de pesticidas en muestras de suelo mediante **HSSPME** [22-24]. Recientemente también se ha desarrollado un método basado en la *cold activated fiber* SPME (CACF-SPME) para la determinación de pesticidas organoclorados en suelo [25].

Probablemente, el lento desarrollo de la SPME aplicada a la determinación de compuestos orgánicos en muestras de suelo, en contraste con su rápido progreso en agua, se deba a dos importantes **inconvenientes** de la técnica. En primer lugar, se debe tener en cuenta que la presencia de materia orgánica en las muestras de suelo puede influir de manera importante en la recuperación de los analitos a extraer. En segundo lugar, la aplicación de la SPME a suelos no permite el uso directo de curvas de calibrado externas, siendo necesario el uso de patrones internos marcados isotópicamente o de calibrados con rectas de adición [26].

2.6.3 ANÁLISIS DE ALIMENTOS

En general, la aplicación de la SPME a muestras de alimentos requiere una **etapa previa de preparación de la muestra**. Por ejemplo, cuando se analiza **fruta** a menudo se batien las muestras vigorosamente (*high speed blending*) utilizando mezclas acetonitrilo-agua [27] o agua [28, 29], o se extraen previamente mediante ultrasonidos [30]. Las muestras líquidas, como **zumos de fruta** o **vino**, se suelen extraer directamente como las muestras de agua, aunque en ocasiones se diluyen con agua destilada para así reducir o eliminar las interferencias de la matriz [29, 31-35]. También se ha recurrido a la dilución de las muestras con agua en el análisis de pesticidas en **miel** [36].

La **SPME** también se ha aplicado al análisis de pesticidas en muestras de **leche** [37-40]. En algunos casos, para resolver los problemas derivados de la complejidad y el carácter lipofílico de las muestras, se adoptaron diferentes estrategias de tratamiento de la muestra previas a la inmersión de la fibra en la misma [38, 39]. En el análisis de pesticidas organoclorados en leche materna, se añadió ácido perclórico para romper las interacciones analito-matriz, y se eligió HSSPME como modo de muestreo para

evitar daños en la fibra e interferencias provocadas por otros componentes de la leche [39]. En otro estudio se utilizó una membrana hueca de polipropileno alrededor de la fibra como material protector durante la SPME en la extracción de herbicidas de leche de vaca [40].

2.6.4 ANÁLISIS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS

La aplicación de la SPME a la determinación de pesticidas en muestras biológicas (sangre, orina, tejidos...) es bastante **limitada**, especialmente cuando se compara con el elevado número de aplicaciones medioambientales y alimentarias de esta técnica. Para el análisis de este tipo de muestras, en general se recurre a la extracción en espacio de cabeza (**HSSPME**) para, de este modo, evitar las interferencias derivadas de matrices tan complejas. Así, por ejemplo, Tsoukali y col. [41] emplearon HSSPME para la determinación de metil-paratión en **muestras biológicas post-mortem** (sangre, tejidos de hígado y riñón). Las muestras de tejido requirieron una etapa previa en la que se batieron con agua a gran velocidad. De modo semejante, Hernández y col. [42] determinaron pesticidas organoclorados y organofosforados en **sangre** mediante HSSPME diluyendo antes las muestras con agua. No obstante, también se han publicado trabajos en los que se analizaron pesticidas organoclorados y organofosforados en muestras de **orina** y **suero** mediante SPME directa (**DSPME**), previa dilución de las muestras con agua ultrapura [43, 44].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cela, R.; Lorenzo, R.A.; Casais, M.C. *Técnicas de Separación en Química Analítica*, Ed. Síntesis, **2002**.
- [2] Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*, Ed. Wiley-VHC, Inc., **1997**.
- [3] Kataoka, H.; Lord, H.L.; Pawliszyn, P. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* **2000**, 880, 35-62.
- [4] <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html>> (Consulta: 09-06-09).

- [5] Arthur, C.L.; Killam, L.M.; Bucholz, K.D.; Pawliszyn, J.; Berg, J.R. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1960-1966.
- [6] Eisert, R.; Levsen, K. Determination of pesticides in aqueous samples by solid-phase microextraction in-line coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1995**, 6, 1119-1130.
- [7] Page, B.D.; Lacroix, G. Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of semi-volatile organochlorine contaminants in aqueous matrices. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 757, 173-182.
- [8] Boyd-Boland, A.A.; Pawliszyn, J.B. Solid-phase microextraction of nitrogen-containing herbicides. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 704, 163-172.
- [9] Mmualefe, L.C.; Torto, N.; Huntsman-Mapila, P.; Mbongwe, B. Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry. *Microchem. J.* **2009**, 91, 239-244.
- [10] Torres Padrón, M.E.; Sosa Ferrera, Z.; Santana Rodríguez, J.J. Optimisation of solid-phase microextraction coupled to HPLC-UV for the determination of organochlorine pesticides and their metabolites in environmental liquid samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 332-340.
- [11] Fidalgo-Used, N.; Montes-Bayón, M.; Blanco-González, E.; Sanz-Medel, A. Determination of organophosphorus pesticides in spiked river water samples using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with EI-MS and ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, 20, 876-882.
- [12] Sakamoto, M.; Tsutsumi, T. Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1028, 63-74.
- [13] Casas, V.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T. Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid pesticides in water. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1124, 148-156.
- [14] Lambropoulou, D.A.; Sakkas, V.A.; Albanis, T.A. Validation of an SPME method, using PDMS, PA, PDMS-DVB, and CW-DVB SPME fiber coatings, for analysis of organophosphorus insecticides in natural waters. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 374, 932-941.

- [15] Beceiro-González, E.; Concha-Graña, E.; Guimaraes, A.; Gonçalves, C.; Muniategui-Lorenzo, S.; Alpendurada, M.F. Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1141, 165-173.
- [16] Lee, M.-R.; Yeh, Y.-C.; Hsiang, W.-S.; Hwang, B.-H. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determining chlorophenols from landfill leaches and soil. *J. Chromatogr. A* **1998**, 806, 317-324.
- [17] Möder, M.; Popp, P.; Eisert, R.; Pawliszyn, J. Determination of polar pesticides in soil by solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 363, 680-685.
- [18] Herbert, P.; Morais, S.; Paiga, P.; Alves, A.; Santos, L. Development and validation of a novel method for the analysis of chlorinated pesticides in soils using microwave-assisted extraction-headspace solid phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 810-816.
- [19] Hernández, F.; Beltrán, J.; López, F.J.; Gaspar, J.V. Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2313-2322.
- [20] Bouaid, A.; Ramos, L.; González, M.J.; Fernández, P.; Cámara, C. Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, 939, 13-21.
- [21] Vega Moreno, D.; Sosa Ferrera, Z.; Santana Rodríguez, J.J. Microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in soil samples. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 571, 51-57.
- [22] Ng, W.F.; Teo, M.J.K.; Lakso, H.-Å. Determination of organophosphorus pesticides in soil by headspace solid-phase microextraction. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 363, 673-679.
- [23] Zhao, R.; Wang, X.; Yuan, J.; Jiang, T.; Fu, S.; Xu, X. A novel headspace solid-phase microextraction method for the exact determination of organochlorine

- pesticides in environmental soil samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 1584-1589.
- [24] Doong, R.-A.; Liao, P.-L. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2001**, 918, 177-188.
- [25] Chai, X.; Jia, J.; Sun, T.; Wang, Y.; Liao, L. Application of a novel cold activated fiber-solid phase microextraction for analysis of organochlorine pesticides in soil. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2007**, 42, 629-634.
- [26] Beltrán, J.; López, F.J.; Hernández, F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J. Chromatogr. A* **2000**, 885, 389-404.
- [27] Crook, S.J. Presented at the 8th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Almeria, **1997**.
- [28] Fytianos, K.; Raikos, N.; Theodoridis, G.; Velinova, Z.; Tsoukali, H. Solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in fruits. *Chemosphere*, **2006**, 65, 2090-2095.
- [29] Simplicio, A.L.; Boas, L.V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A* **1999**, 833, 35-42.
- [30] Beltrán, J.; Peruga, A.; Pitarch, E.; López, F.J.; Hernández, F. Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 376, 502-511.
- [31] Sagratini, G.; Mañes, J.; Giardiná, D.; Damiani, P.; Picó, Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1147, 135-143.
- [32] Farajzadeh, M.A.; Hatami, M. Solid-phase microextraction gas chromatography for determination of some organophosphorus pesticides. *Chromatographia* **2004**, 59, 259-262.
- [33] Zambonin, C.G.; Quinto, M.; De Vietro, N.; Palmisano, F. Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chem.* **2004**, 86, 269-274.

- [34] Vitalif, M.; Guidotti, M.; Giovinazzo, R.; Cedronet, O. Determination of pesticide residues in wine by SPME and GC/MS for consumer risk assessment. *Food Addit. Contam.* **1998**, 15, 280-287.
- [35] Urruty, L.; Montury, M.; Braci, M.; Fournier, J.; Dournel, J.-M. Comparison of two recent solventless methods for the determination of procymidone residues in wines: SPME/GC/MS and ELISA tests. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1519-1522.
- [36] Jimenez, J.J.; Bernal, J.L.; del Nozal, M.J.; Martín, M.T.; Mayorga, A.L. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, 829, 269-277.
- [37] Cardeal, Z.L.; Dias-Paes, C.M. Analysis of organophosphorus pesticides in whole milk by solid phase microextraction gas chromatography method. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2004**, 41, 369-375.
- [38] González-Rodríguez, M.J.; Arrebola-Liébanas, F.J.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L.; Sánchez López, F.J. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 164-172.
- [39] Röbrig, L.; Meisch, H.-U. Application of solid phase microextraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 106-111.
- [40] Basheer, C.; Lee, H.K. Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine milk and sewage sludge samples. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1047, 189-194.
- [41] Tsoukali, H.; Raikos, N.; Theodoridis, G.; Psaroulis, D. Headspace solid phase microextraction for the gas chromatographic analysis of methyl-parathion in post-mortem human samples: Application in a suicide case by intravenous injection. *Forensic Sci. Int.* **2004**, 143, 127-132.
- [42] Hernández, F.; Pitarch, E.; Beltrán, J.; López, F.J. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood. *J. Chromatogr. B* **2002**, 769, 65-77.

- [43] López, F.J.; Pitarch, E.; Egea, S.; Beltran, J.; Hernández, F. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 433, 217-226.
- [44] Pitarch, E.; Egea, S.; Beltran, J.; López, F.J.; Hernández, F. Presented at the 11th Meeting of Spanish Society for Analytical Chemistry, Valencia, **1999**.

CAPÍTULO I.3. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)

3.1 INTRODUCCIÓN

En 1989, Barker y colaboradores introdujeron un nuevo método para la disrupción y extracción de muestras sólidas: la **dispersión de matriz en fase sólida** (*matrix solid-phase dispersion*, **MSPD**) [1]. Este procedimiento combina aspectos de varias técnicas para la **disrupción de la muestra** y, al mismo tiempo, genera un material que posee un carácter cromatográfico único para la extracción de los compuestos de interés de una muestra dada. Las primeras aplicaciones de la MSPD estaban orientadas al aislamiento de **metabolitos de fármacos** de matrices biológicas, pero posteriormente esta técnica también se ha aplicado a la extracción de compuestos naturales (vitaminas, flavonoides), **pesticidas** y otros contaminantes de **tejidos animales, frutas, verduras** y otras matrices alimentarias, biológicas y medioambientales.

En su concepción original, la MSPD implicaba la **mezcla** de una muestra viscosa, sólida o semisólida con un **soporte sólido de sílica (SiO_2)** previamente derivatizado para producir en su superficie una **fase orgánica enlazada**, como por ejemplo octadecilsilil (**C₁₈**). Este soporte sólido tiene la misma utilidad que la arena cuando ésta se utiliza como **abrasivo**: las fuerzas cortantes que surgen de la mezcla entre la muestra y el soporte sólido con un **mortero** y un **pistilo** (u otro dispositivo mecánico) perturban la arquitectura bruta de la muestra, rompiendo el material en pedazos de menor tamaño. Además, la presencia de una fase orgánica enlazada proporciona una dimensión adicional al proceso: los componentes de la muestra se **disuelven y dispersan** en la fase orgánica enlazada sobre la superficie de las partículas del soporte sólido, conduciendo a la **disrupción** completa de la muestra y a su **dispersión** sobre dicha superficie. Así, a través de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de los diferentes componentes de la muestra sobre la superficie de la fase enlazada, se produce una fase con características únicas para llevar a cabo el aislamiento del analito de interés [2]. Como se detallará más adelante, en los últimos años muchas aplicaciones de la MSPD han supuesto la mezcla de las muestras con **silicatos sin**

derivatizar (sílica gel, arena, etc.) u otros **sólidos orgánicos** (fibras grafitizadas) o **inorgánicos** (Florisil, alúmina, etc.) que también provocan la disrupción de la muestra pero que no poseen, aparentemente, las mismas propiedades dispersivas que el C₁₈. [3]

La MSPD conlleva una serie de **ventajas** sobre los procedimientos clásicos de tratamiento de muestra:

1. el procedimiento analítico se **simplifica** y **acorta** drásticamente;
2. se **elimina** la posibilidad de formación de **emulsiones**;
3. el consumo de **disolventes** se **reduce** sustancialmente;
4. se **mejora** la **eficacia** de la extracción de los analitos puesto que toda la muestra se expone al extractante. [4]

Además, en comparación con otras técnicas como PSE (extracción con disolventes presurizados), en la MSPD se utilizan **condiciones de extracción moderadas** (temperatura ambiente, presión atmosférica) lo que, junto con la combinación adecuada de agente dispersante y disolvente de elución, normalmente conduce a **recuperaciones aceptables** y a una **selectividad media**. Otras ventajas adicionales de esta técnica son su **bajo coste** y la posibilidad de llevar a cabo, simultáneamente, las etapas de **extracción y limpieza**. [5, 6]

3.2 ETAPAS DE LA DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA

El procedimiento de la MSPD comprende los siguientes pasos (Figura I.3.1) [2, 5]:

1. Una **muestra** líquida, semisólida o sólida se añade a un mortero (vidrio, porcelana, ágata) y se **mezcla** con un **agente dispersante** utilizando un pistilo, con el objetivo de conseguir la completa disrupción y dispersión de la muestra sobre dicho dispersante. Se suele trabajar con tamaños pequeños de muestra (alrededor de **0.5 g**). En algunos procedimientos se han utilizado abrasivos que también poseen propiedades de **agente de secado**, como **sílica** o **sulfato sódico anhidro**, conduciendo a la formación de un material

finamente dividido pero también lo suficientemente seco para la posterior extracción [4].

2. Cuando se ha completado la etapa de disrupción y dispersión de la muestra, la mezcla resultante se **empaqueta** en una columna vacía o sobre un absorbente de SPE (extracción en fase sólida). La columna es a menudo un **cuerpo de jeringa** vacío o un **cartucho** con una frita de acero inoxidable o polipropileno, un filtro de celulosa o un tapón de lana de vidrio silanizada en su parte inferior. Muy a menudo se coloca una segunda frita o tapón sobre la mezcla para después llevar a cabo la compresión de la misma con el émbolo de una jeringa. En este punto, se deben tener en cuenta los **principios de una buena cromatografía**: evitar la formación de canales en la columna y no compactar demasiado el material.
3. En cuanto a la etapa de **elución**, hay dos posibilidades:
 - a) los analitos se quedan retenidos en la columna y las interferencias se eluyen en una etapa de lavado y, a continuación, los analitos se eluyen con un disolvente diferente; o,
 - b) las interferencias de la matriz se retienen selectivamente en la columna y los analitos se eluyen directamente.

En cualquier caso, la adición del disolvente de elución debe estar precedida por el uso de parte o todo el disolvente resultante del enjuague del mortero y del pistilo. Puesto que toda la muestra está presente en la columna, también es posible llevar a cabo **eluciones múltiples o secuenciales** de dicha muestra. Esta propiedad permite el aislamiento de un único compuesto, de una clase de compuestos o incluso de varias clases de compuestos de una misma muestra. La mayoría de las eluciones se llevan a cabo **por gravedad** aunque, en algunos casos, el flujo se inicia aplicando presión en cabeza de columna o colocando las columnas en un sistema a vacío (*vacuum box*) y aplicando succión. De modo similar, en otros métodos se han empleado sistemas a vacío para controlar el flujo de varios disolventes de elución.

4. Finalmente, se puede llevar a cabo una etapa de **limpieza** adicional o, directamente, analizar la muestra. En muchos casos se recurre al uso de **co-columnas** para obtener un mayor grado de fraccionamiento y limpieza de la muestra.

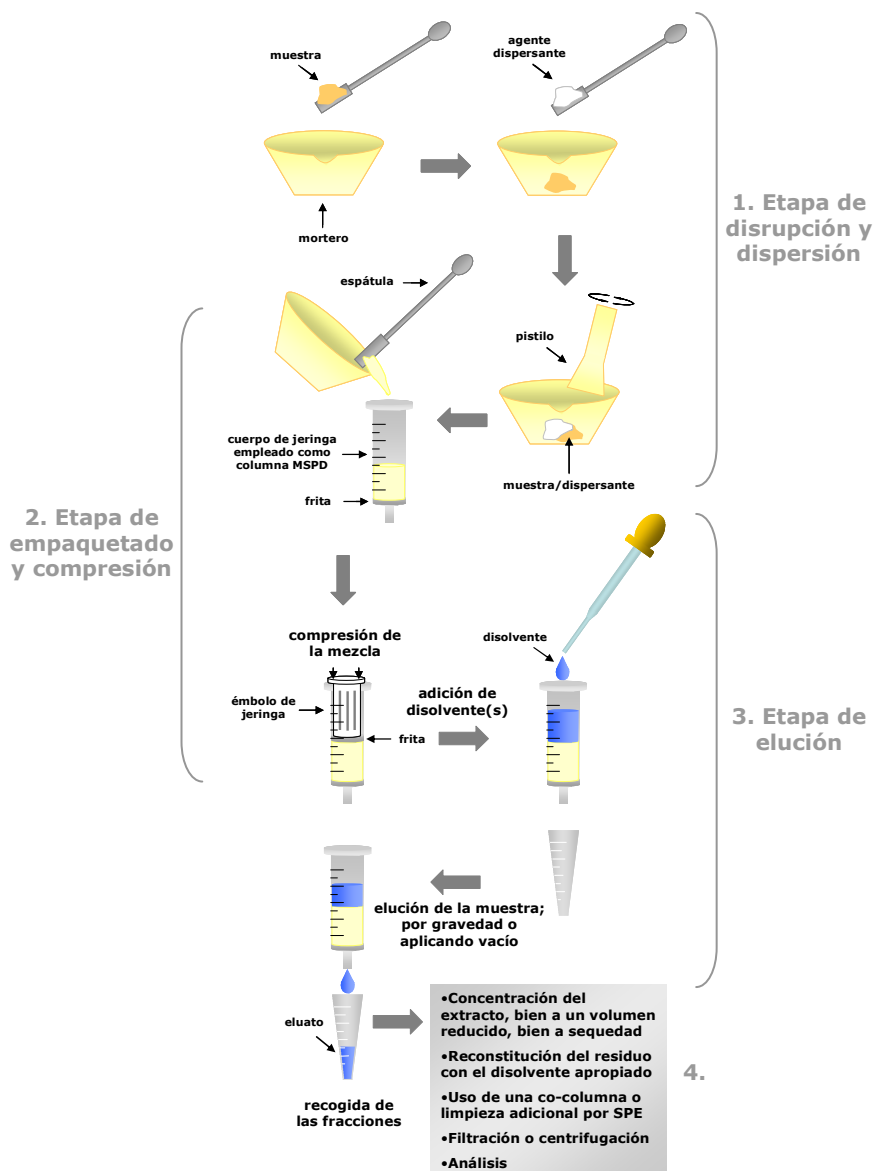


Figura I.3.1 Representación esquemática del proceso de MSPD.

3.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MSPD

3.3.1 AGENTE DISPERSANTE

Como ya se mencionó antes, la MSPD tal y como la definió Barker implica el uso de agentes dispersantes con una **base de sílica**. Un aspecto positivo del uso de estos materiales reside en la presencia de grupos **silanol (SiOH)** sin derivatizar tanto en la superficie como en los poros de dichos materiales. Estos grupos silanol pueden jugar un papel importante a la hora de proporcionar una muestra más **seca** que la que se obtendría si se utilizase un material que careciese de grupos funcionales capaces de formar enlaces puentes de hidrógeno [2]. En lo que se refiere a la **fase enlazada**, la mayoría de las aplicaciones utilizan un material de **fase-inversa**, especialmente **C₁₈** [7-15] y **C₈** [16-19]. También hay algunos trabajos en los que se ha utilizado cianopropilo (CNPr) y otros materiales relacionados de **fase-normal** como fases enlazadas [20]. Estas fases más polares se utilizan en los casos en los que el objetivo es aislar analitos más polares, mientras que los materiales de fase-inversa se emplean para aislar especies más lipofílicas [2].

Sin embargo, muchos autores han adoptado el acrónimo MSPD a pesar de haber utilizado otros materiales alternativos a los dispersantes de sílica enlazada. Así, en los últimos años, la selectividad de la MSPD se ha mejorado mediante la introducción de **materiales no-enlazados**, como son **sílica gel** [21-23], **Florisil** [24-28] o **alúmina** [29-31]. Estos materiales interaccionan con los componentes de la muestra sólo por **adsorción** y, obviamente, no son capaces de disolver la matriz de la muestra. No obstante, las propiedades de estos adsorbentes se pueden ajustar dependiendo de su contenido en agua y de su carácter ácido o básico [6]. Así, por ejemplo, la retención de los compuestos en sílica se puede cambiar modificando su superficie con un ácido. Los compuestos básicos se retendrán entonces a través de los puentes de hidrógeno formados entre los grupos silanol y la base a través del ácido añadido. Los constituyentes ácidos o neutros de la matriz y las interferencias se pueden eluir previamente a los compuestos básicos utilizando un disolvente apolar. A continuación, un disolvente relativamente polar, que forme enlaces de hidrógeno relativamente fuertes con los grupos silanol, se puede utilizar para desplazar a la base y eluir selectivamente a los analitos de la columna de MSPD [5].

En algunas aplicaciones también se han utilizado soportes inertes como **tierra de diatomeas** [32] o **arena** [33], principalmente para permitir la elución temprana de interferencias que no serían retenidas por ningún adsorbente durante la elución de los analitos. Se trata de métodos más **baratos**, pero a expensas de una **selectividad limitada**, ya que solo está controlada por la solubilidad de los diferentes componentes de la muestra en el disolvente de elución. Recientemente se han utilizado **otros dispersantes** poco convencionales, como **fibras de carbón activado** [34] o polímeros de impresión molecular (**MIPs**) [35].

El tamaño de poro del agente dispersante no es un factor demasiado importante. No obstante, el **tamaño de partícula** sí que es un parámetro a tener en cuenta. El uso de partículas de 3-20 μm de diámetro conduce a flujos bajos o, incluso, inexistentes. La mayoría de las aplicaciones de MSPD han utilizado partículas de 40 μm de diámetro. También se ha observado que un tamaño de partícula no uniforme, pero comprendido entre 40 y 100 μm , funciona bien. [2]

Las relaciones **muestra/dispersante** están habitualmente comprendidas **entre 1:1 y 1:4**, pero esta ratio depende de cada aplicación en particular y es una variable que se debe examinar durante el desarrollo del método [5]. Por otro lado, la facilidad para conseguir una **mezcla homogénea** con el dispersante depende básicamente de la matriz considerada. Así, para muestras líquidas de baja viscosidad (p. ej. zumos, vino, leche, etc.) normalmente es suficiente con agitar para conseguir una capa fina de muestra alrededor de las partículas de adsorbente [6].

3.3.2 DISOLVENTE DE ELUCIÓN

La selección del disolvente de elución a utilizar es función de la **polaridad** del analito. Las **sustancias no-polares** se pueden recuperar utilizando **disolventes apolares**, como son hexano [26], diclorometano [19, 31] o mezclas de ambos [27, 36]. Cuando los compuestos tienen una **polaridad media** o alta, las opciones más empleadas son acetonitrilo [12], acetona [37], acetato de etilo [7, 11], o mezclas de agua con etanol [38] o metanol [39]. Por otro lado, el **agua caliente** también se ha aplicado con éxito a la extracción de contaminantes polares o moderadamente polares de matrices

sólidas (fundamentalmente de alimentos) [40]. El uso de agua caliente como extractante conlleva una serie de ventajas como son su bajo precio, su respetuosidad por el medioambiente y la compatibilidad con la cromatografía líquida de fase inversa [6].

No obstante, también se debe tener en cuenta la retención y elución de los componentes de la matriz de la muestra. Es decir, la secuencia y diseño de un perfil de elución debe retener a la muestra lo más posible en la columna, y eluir a los analitos con un elevado grado de especificidad. [2]

Varios estudios han demostrado que, cuando se considera la mezcla de 0.5 g de muestra con 2 g de agente dispersante, la mayoría de los analitos se eluyen en los primeros **4 mL** [41]. De todas formas, el volumen de elución varía en función de la aplicación y es un parámetro que se debe examinar para reducir en lo posible el uso de disolvente orgánico y la coelución de interferencias [3].

3.3.3 MODIFICACIÓN DE LA MATRIZ

A veces es necesario alterar el estado de ionización de los componentes de la muestra para asegurar que tienen lugar ciertas **interacciones** con la fase enlazada del soporte sólido y/o el disolvente de elución. Esto se puede llevar a cabo mediante la adición de ácidos, bases, sales, agentes quelatantes o desquelatantes, antioxidantes, etc. durante la etapa de mezclado de la muestra y/o como aditivo en el disolvente de elución. [2]

3.3.4 TEMPERATURA Y PRESIÓN

Recientemente, varias aplicaciones han **combinado** la extracción con disolventes presurizados (**PSE**) con la **MSPD** con el objetivo de conseguir extracciones más rápidas, más automatizadas y más exhaustivas [6]. De hecho, en PSE son habituales las aplicaciones en las que la muestra se dispersa con arena o tierra de diatomeas [42, 43] y, además, también se han publicado algunas aplicaciones con adsorbentes no-inertes [44].

3.4 ETAPAS DE LIMPIEZA

Aunque a veces los extractos obtenidos mediante MSPD son lo suficientemente limpios como para ser analizados directamente, a menudo se requiere una etapa de **limpieza**. En algunos casos, previamente a la elución de los analitos, se recurre al **lavado de la columna** con un disolvente adecuado. Por ejemplo, cuando los analitos son polares es habitual utilizar un **disolvente apolar** (p.ej. hexano, diclorometano) para eliminar los componentes menos polares de la matriz (p.ej. lípidos) [45, 46]. Por otro lado, se suele utilizar agua cuando es necesario eliminar compuestos polares (p.ej. pigmentos) de la muestra [14]. Evidentemente, cuando las etapas de lavado y elución se llevan a acabo con disolventes inmiscibles, el cartucho de MSPD se debe secar con una corriente de nitrógeno entre ambas etapas [6].

Como ya se adelantó antes, en la MSPD es habitual recurrir a procedimientos de limpieza que implican el uso de una **co-columna**. El material de la co-columna se puede empaquetar en la parte inferior de la misma columna MSPD o se puede acoplar en serie (**SPE on-line**) mediante una columna SPE con el objetivo de retener las interferencias de la matriz [5]. En general se recurre a la primera opción y se suelen utilizar **materiales de fase normal** para retener las interferencias polares que podrían eluir de las muestras dispersadas sobre C₁₈ u otros dispersantes de fase inversa. Así, por ejemplo, alúmina [28], sílica [7] y Florisil [13, 47] se han utilizado como co-sorbentes en la extracción de pesticidas de vegetales y frutas. En el caso de analitos de una elevada estabilidad química (p.ej. PCBs, PBDEs, y PBBs), a menudo se sitúa una capa de sílica acidificada (en la mayoría de los casos con un 44% de ácido sulfúrico) en el fondo del cartucho de MSPD [48]. Esta alternativa conduce a la obtención de extractos libres de grasa.

El acoplamiento de la MSPD con la **SPE** también puede ser **off-line** mediante la utilización de cartuchos de sílica gel [14], alúmina [28], C₁₈ [31], etc. Otros **procedimientos de limpieza a posteriori** incluyen la extracción líquido-líquido de un extracto acuoso en un disolvente orgánico para eliminar las interferencias polares [49] o la agitación vigorosa de un extracto orgánico en ácido sulfúrico para eliminar interferencias lipídicas [27].

Sin embargo, la disponibilidad de técnicas de análisis de elevada sensibilidad y selectividad como **LC/MS** [9, 50] hace que en algunos casos estas etapas extra de limpieza no sean necesarias.

3.5 MINIATURIZACIÓN

En ocasiones, la cantidad de muestra disponible para su análisis es limitada, particularmente en el caso de muestras biológicas, por lo que los errores en la etapa de preparación de muestra se hacen inadmisibles, y los protocolos que implican el uso de pequeñas cantidades de muestra pasan a ser muy valiosos. Así, algunos autores han optimizado extracciones por MSPD utilizando alícuotas de muestra de 50 mg o menos. Además, en algunos de estos trabajos, el volumen de disolvente de elución se ha reducido a unos pocos microlitros. [18, 51]

3.6 APLICACIONES DE LA MSPD AL ANÁLISIS DE PESTICIDAS

3.6.1 ANÁLISIS DE FRUTAS, VERDURAS, CEREALES Y DE OTRAS MATRICES VEGETALES

Hay bastantes estudios centrados en la determinación de pesticidas en **frutas** mediante MSPD. En la mayoría de ellos se utiliza **C₈** [16-19] o **C₁₈** [7, 9, 13, 52, 53] para la dispersión de las muestras. Aunque, por ejemplo, en la extracción de pesticidas organofosforados y piretroides de anacardos y frutas de la pasión [24], así como en la extracción de hexaclorociclohexano de varias frutas (limón, naranja, manzana, etc.) [28] se utilizó **Florisil**, mientras que en la extracción de varios pesticidas en manzana se emplearon nanotubos de carbono (**MWCNTs**) [47] y en la extracción de ditiocarbamatos y algunos de sus metabolitos en ciertas frutas se utilizó carbón no-poroso grafitizado [50]. En algunos de estos trabajos, el mismo método de extracción en frutas se aplicó a **plantas o verduras** como pepinos, alcachofas, tomates, zanahorias, calabacines, lechugas o patatas [7, 17, 19, 47, 50, 52]. Se han propuesto, además, algunos métodos MSPD para el análisis de residuos de pesticidas en matrices vegetales (frutas, cereales, alcachofas, judías, berenjenas, guisantes, coles, etc.) en los que llama la atención el uso de tamaños de muestra de 5 g y de grandes volúmenes de elución (100-120 mL) [21, 54-58].

La MSPD también se ha aplicado a la extracción de pesticidas de **zumos de frutas** utilizando como dispersante **Florisil** [25] o **tierra de diatomeas** [32, 59]. Se recurrió a la misma técnica para la determinación de insecticidas y herbicidas en **aceitunas**, aunque para esta matriz se empleó C_{18} [12] o sílica enlazada a grupos aminopropilo (bondesil-NH₂) [60] como dispersante. Finalmente, también se han desarrollado métodos basados en la MSPD para el análisis de pesticidas en otras matrices vegetales como **té** [36] o **tabaco** [26].

3.6.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE TEJIDOS Y GRASAS DE ORIGEN ANIMAL

Para la extracción de analitos de **tejidos animales**, C_{18} es el dispersante más popular. Así, por ejemplo, C_{18} fue el material utilizado en la extracción por MSPD de **pesticidas organoclorados** de músculo de siluro [61], de ostras [62], de hepatopáncreas de cangrejo [63] y de tejidos de pescado [64]. Además, en todos estos trabajos se empleó una co-columna de Florisil para retener los lípidos de las muestras. El mismo dispersante se empleó en un método de MSPD desarrollado para la extracción de pesticidas organofosforados de muestras de hígado y músculo de ganado bovino [14]. Por otro lado, en la determinación de DDT, DDE y DDD en **grasas animales** (cerdo, vaca, pollo), las muestras se dispersaron con **fibra de carbón activado** (KF®-1500) [34, 65].

3.6.3 ANÁLISIS DE OTRAS MATRICES ALIMENTARIAS DE ORIGEN ANIMAL

La MSPD se ha aplicado a la extracción de pesticidas en **leche**. En todos los trabajos publicados, se mezclaron las muestras de leche con C_{18} y como etapa de limpieza se recurrió a la utilización de co-columnas de Florisil [15], a la SPE en tándem con cartuchos de Florisil [66] o a la SPE off-line empleando alúmina como adsorbente [67].

Por otro lado, Florisil fue el agente dispersante utilizado en la extracción de pesticidas en **miel** [68, 69] y **huevos** [27]. En este último caso fue necesaria, además de una columna de Florisil, una etapa de limpieza a posteriori utilizando ácido sulfúrico.

3.6.4 ANÁLISIS DE OTRAS MUESTRAS

La MSPD también se ha utilizado en la extracción de pesticidas de varios **insectos** como son las abejas [10, 70] o los isópodos [8]. Son escasos los trabajos en los que esta técnica se haya aplicado a la extracción de plaguicidas en **suelos** [71] y otras matrices sólidas medioambientales como son los **lodos** [31].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barker, S.A.; Long, A.R.; Short C.R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr.* **1989**, 475, 353-361.
- [2] Barker, S.A. Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, 115-127.
- [3] Barker, S.A. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, 151-162.
- [4] Bogialli, S.; Di Corcia, A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *J. Biochem. Biophys. Methods*. **2007**, 70, 163-179.
- [5] Kristenson, E.M.; Ramos, L.; Brinkman U.A.T. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 96-111.
- [6] García-López, M.; Canosa, P.; Rodríguez, I. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 963-974.
- [7] Navarro, M.; Picó, Y.; Marín, R.; Mañes, J. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* **2002**, 968, 201-209.
- [8] Kristenson, E.M.; Shahmiri, S.; Slooten, C.J.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.T. Matrix solid-phase dispersion micro-extraction of pesticides from single insects with subsequent GC-MS analysis. *Chromatographia* **2004**, 59, 315-320.
- [9] Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. Routine application using single quadrupole liquid chromatography-mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1088, 224-233.
- [10] Totti, S.; Fernández, M.; Ghini, S.; Picó, Y. ; Fini, F. ; Mañes, J. ; Girotti, S. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid.

- carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography-mass spectrometry detection. *Talanta* **2006**, 69, 724-729.
- [11] Garrido Frenich, A.; Plaza Bolaños, P.; Martínez Vidal, J.L. Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1153, 194-202.
- [12] Cunha, S.C.; Fernandes, J.O.; Beatriz, M.; Oliveira, P.P. Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **2007**, 73, 514-522.
- [13] Dantas Silva, M.G.; Aquino, A.; Silveira Dórea, H.; Navickiene, S. Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. *Talanta* **2008**, 76, 680-684.
- [14] García de Llasera, M.P.; Reyes-Reyes, M.L. A validated matrix solid-phase dispersion method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples. *Food Chem.* **2009**, 114, 1510-1516
- [15] Macedo, A.N.; Nogueira, A.R.A.; Govoni Brondi, S.H. Matrix solid-phase dispersion extraction for analysis of cypermethrin residue in cows' milk. *Chromatographia* **2009**, 69, 571-573.
- [16] Valenzuela, A.I.; Lorenzini, R.; Redondo, M.J.; Font, G. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruits. *J. Chromatogr. A* **1999**, 839, 101-107.
- [17] Fernández, M.; Picó, Y.; Mañes, J. Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2000**, 871, 43-56.
- [18] Kristenson, E.M.; Haverkate, E.G.J.; Slooten, C.J.; Ramos, L.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.T. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* **2001**, 917, 277-286.
- [19] Kruve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1187, 58-66.
- [20] Barker, S.A.; Long, A.R. Tissue drug residue extraction and monitoring by matrix solid phase dispersion (MSPD)-HPLC analysis. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **1992**, 15, 2071-2089.

- [21] Michel, M.; Buszewski, B. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *J. Chromatogr. B* **2004**, 800, 309-314.
- [22] Minuti, L.; Pellegrino, R. Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1185, 23-30.
- [23] Santana dos Santos, T.F.; Aquino, A.; Dórea, H.S.; Navickiene, S. MSPD procedure for determining buprofezin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin residues in propolis by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 1425-1430.
- [24] Silveira Dórea, H.; Mauro Lanças F. Matrix solid-phase dispersion of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in cashew nut and passion fruit. *J. Microcolumn Separations*, **1999**, 11, 367-375.
- [25] Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J.L. Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6915-6921.
- [26] Cai, J.; Gao, Y.; Zhu, X.; Su, Q. Matrix solid phase dispersion-Soxhlet simultaneous extraction clean-up for determination of organochlorine pesticide residues in tobacco. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, 869-874.
- [27] Valsamaki, V.I.; Boti, V.I.; Sakkas, V.A.; Albanis, T.A. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 573-574, 195-201.
- [28] Abhilash, P.C.; Jamil, S.; Singh, N. Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1176, 43-47.
- [29] Kishida, K.; Furusawa, N. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. *J. Chromatogr. A* **2001**, 937, 49-55.
- [30] Hu, Y.-Y.; Zheng, P.; Zhang, Z.-X. ; He, Y.-Z. Determination of aflatoxins in high-pigment content samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 4126-4130.

- [31] Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Tadeo, J.L. Determination of organochlorine pesticides in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, **2008**, 1211-1217.
- [32] Radišić, M.; Grujić, S.; Vasiljević, T.; Laušević, M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2009**, 113, 712-719.
- [33] Manhita, A.C.; Teixeira, D.M.; da Costa, C.T. Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1129, 14-20.
- [34] Furusawa, N. Separating DDTs in edible animal fats using matrix solid-phase dispersion extraction with activated carbon filter, Toyobo-KF. *J. Chromatogr. Sci.* **2006**, 44, 498-503.
- [35] Guo, L.; Guan, M.; Zhao, C.; Zhang, H. Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion for extraction of chloramphenicol in fish tissues coupled with high-performance liquid chromatography determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 392, 1431-1438.
- [36] Hu, Y.-Y.; Zheng, P.; He, Y.-Z.; Sheng, G.-P. Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1098, 188-193.
- [37] García, M.; Rodríguez, I.; Cela, R. Optimisation of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of organophosphate compounds in dust samples. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 590, 17-25.
- [38] Kishida, K.; Furusawa, N. Toxic/harmful solvents-free technique for HPLC determination of six sulfonamides in meat. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2003**, 26, 2931-2939.
- [39] Ruiz, M.J.; Cameán, A.M.; Moreno, I.M.; Picó, Y. Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1073, 257-262.
- [40] Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Tramontana, G. Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: Laboratory validation in line with European Union Commission Decision 657/2002/EC. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 794-800.

- [41] Barker, S.A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 880, 63-68.
- [42] Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L.; Cruz Sicilia, A.D.; González Rodríguez, M.J.; Plaza Bolaños, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 558, 42-52.
- [43] Kot-Wasik, A.; Wasik, A. Determination of robenidine in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 543, 46-51.
- [44] Canosa, P.; Pérez-Palacios, D.; Garrido-López, A.; Tena, M.T.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R. Pressurized liquid extraction with in-cell clean-up followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry for the selective determination of parabens and triclosan in indoor dust. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1161, 105-112.
- [45] Canosa, P.; Rodríguez, I. Rubí, E.; Cela, R. Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 1675-1681.
- [46] Tolls, J.; Samperi, R.; Di Corcia, A. Bioaccumulation of LAS in feral fish studied by a novel LC-MS/MS method. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 314-320.
- [47] Fang, G.; Min, G.; He, J.; Zhang, C.; Qian, K.; Wang, S. Multiwalled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction adsorbents to determine 31 pesticides in agriculture samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 3040-3045.
- [48] Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Fernández, F.; Rodil, R.; Cela, R. Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1071, 93-98.
- [49] Kubala-Drincic, H.; Bazulic, D.; Sapurnar-Postruznik, J.; Grubelic, M.; Stuhne, G. Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic determination of chloramphenicol in muscle tissue. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 871-875.
- [50] Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y. Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1028, 267-276.

- [51] Kristenson, E.M.; Shahmiri, S.; Slooten, C.J.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.T. Matrix solid-phase dispersion micro-extraction of pesticides from single insects with subsequent GC-MS analysis. *Chromatographia* **2004**, 59, 315-320.
- [52] Torres, C.M.; Picó, Y.; Mañes, J. Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A* **1997**, 778, 127-137.
- [53] Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. Liquid chromatography-electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1048, 41-49.
- [54] Viana, E.; Moltó, J.C.; Font, G. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. *J. Chromatogr. A* **1996**, 754, 437-444.
- [55] Ling, Y.-C.; Huang, I.-P. Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A* **1995**, 695, 75-82.
- [56] Michel, M.; Buszewski, B. HPLC determination of pesticide residue isolated from food matrices. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2002**, 25, 2293-2306.
- [57] Michel, M.; Buszewski, B. Isolation and determination of carbendazim residue from wheat grain by matrix solid-phase dispersion and HPLC. *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 1269-1272.
- [58] Michel, M.; Gnusowski, B.; Buszewski, B. Comparison of various extraction techniques to determine fungicide residue in wheat grain. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2006**, 29, 247-261.
- [59] Chu, X.-G.; Hu, X.-Z.; Yao, H.-Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1063, 201-210.
- [60] Ferrer, C.; Gómez, M.J.; García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, M.; Fernández-Alba, A.R. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1069, 183-194.
- [61] Long, A.R.; Crouch, M.D.; Barker, S.A. Multiresidue matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated

- pesticides in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1991**, 74, 667-670.
- [62] Lott, H.M.; Barker, S.A. Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic screening of 14 chlorinated pesticides in oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1993**, 76, 67-72.
- [63] Lott, H.M.; Barker, S.A. Extraction and gas chromatographic screening of 14 chlorinated pesticides in crayfish (*Procambarus clarkii*) hepatopancreas. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1993**, 76, 663-668.
- [64] Ling, Y.-C.; Huang, I.-P. Multiresidue-matrix solid-phase dispersion method for determining 16 organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in fish. *Chromatographia* **1995**, 40, 259-266.
- [65] Furusawa, N. Determination of DDT in animal fats after matrix solid-phase dispersion extraction using an activated carbon filter. *Chromatographia*, **2005**, 62, 315-318.
- [66] Schenck, F.J.; Wagner, R. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Addit. Contam.* **1995**, 12, 535-541.
- [67] Yague, C.; Bayarri, S.; Lázarp, R.; Conchello, P.; Arino, A.; Herrera, A. Multiresidue determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in milk by gas chromatography with electron-capture detection after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J. AOAC Int.* **2001**, 84, 1561-1568.
- [68] Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J.L. Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection. *J. AOAC Int.* **2001**, 84, 1165-1171.
- [69] Sánchez-Brunete, C.; Albero, B.; Miguel, E.; Tadeo, J.L. Determination of insecticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and mass spectrometric confirmation. *J. AOAC Int.* **2002**, 85, 128-133.
- [70] Morzycka, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, 982, 267-273.

- [71] Shen, X.; Cai, J.; Gao, Y.; Su, Q. Determination of organophosphorus pesticides in soil by MMSPD-GC-NPD and confirmation by GC-MS. *Chromatographia* **2006**, 64, 71-77.

CAPÍTULO 1.4. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS (PSE)

4.1 INTRODUCCIÓN

La **extracción con disolventes presurizados** (*pressurized solvent extraction*, **PSE**), también conocida como *extracción con fluidos presurizados* (PFE) o por los nombres comerciales *extracción acelerada por disolventes* (ASE™, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) o *extracción con líquidos presurizados* (PLE™, Fluid Management Systems, Inc., MA, USA), se introdujo por vez primera en 1996 [1]. En PSE, el proceso de extracción se lleva a cabo a **presiones elevadas** para así poder trabajar con disolventes en **fase líquida** a temperaturas por encima de su punto de ebullición. El uso simultáneo de presiones y temperaturas elevadas conduce a procesos de extracción más rápidos que los procedimientos clásicos (p.ej. Soxhlet), utilizando volúmenes inferiores de disolventes y disminuyendo, de esta manera, la dilución de la muestra. De hecho, PSE está reconocida como una **técnica de extracción verde** debido a su bajo consumo de disolventes orgánicos [2]. Además, se ha comprobado que, en términos de recuperación y precisión, PSE es equivalente o incluso superior a otras técnicas de extracción como Soxhlet o la extracción asistida por microondas (MAE) [3-5]; de hecho, PSE ya dispone de un **método oficial de la EPA** (método 3545) para la extracción de compuestos orgánicos semivolátiles, insolubles o ligeramente solubles en agua, de suelos, arcillas, sedimentos, lodos y residuos sólidos [6]. Por otra parte, se trata de una técnica altamente **automatizada**, por lo que es especialmente útil a la hora de realizar análisis de rutina; sin embargo, su uso se ha visto parcialmente limitado debido a su **elevado coste** [7].

4.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

Como ya se ha adelantado, en PSE, la extracción se lleva a cabo a temperaturas por encima del punto de ebullición del disolvente lo que implica que la presión en el interior de la celda debe ser lo suficientemente alta como para mantener al disolvente en estado líquido.

4.2.1 PROCESOS DURANTE LA EXTRACCIÓN

En la Figura I.4.1 se muestran los principales procesos que controlan el transporte de los analitos desde la matriz hasta el seno del disolvente durante la extracción [7]:

1. **Desorción** desde una partícula sólida,
2. **Difusión** a través del disolvente localizado en el interior del poro de la partícula,
3. Transferencia hacia el seno del flujo de disolvente (**solubilización**).

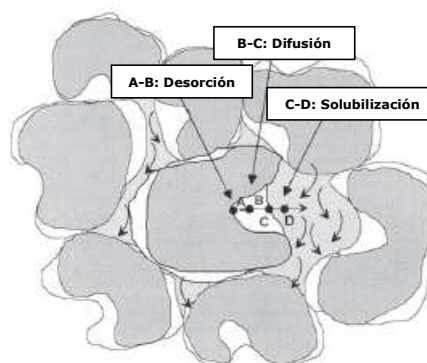


Figura I.4.1 Representación esquemática de los procesos que tienen lugar durante la extracción. [7]

4.2.2 CONSIDERACIONES FÍSICO-QUÍMICAS QUE JUSTIFICAN LA MEJORA DE LAS EXTRACCIONES A TEMPERATURAS Y PRESIONES ELEVADAS

Existen dos razones fundamentales por las que el uso de disolventes a elevadas presiones y temperaturas conduce a extracciones más eficaces que aquéllas llevadas a cabo a temperatura ambiente y a presión atmosférica [1]:

1. Efectos sobre la solubilidad y la transferencia de masa:

- a) Con temperaturas más altas se incrementa la capacidad de los disolventes para **solubilizar** a los analitos.
- b) El incremento de la temperatura de extracción conduce a un incremento de las **velocidades de difusión**.
- c) Si durante la etapa de extracción estática se introduce disolvente nuevo, se incrementa el **gradiente de concentración** entre la disolución presente en la celda de extracción y la superficie de la matriz de la muestra, se mejora la transferencia de masa y, por tanto, se puede incrementar la velocidad de extracción.

2. **Disrupción de los equilibrios superficiales entre analito y matriz:** puesto que tanto la temperatura como la presión juegan un papel importante, ambos parámetros se discutirán por separado.

Efectos de la temperatura:

- a) Como consecuencia de un incremento en la temperatura se pueden **romper las fuertes interacciones soluto-matriz** originadas por enlaces de van der Waals, enlaces de hidrógeno, e interacciones dipolares entre las moléculas de soluto y los sitios activos de la matriz.
- b) Además, temperaturas elevadas pueden **disminuir la viscosidad de los disolventes**, permitiendo una mejor penetración del mismo en las partículas de la matriz y, por tanto, mejorando la extracción.

Efectos de la presión:

- a) Si durante las extracciones se ejerce una presión suficiente sobre el disolvente, se pueden emplear temperaturas por encima de su punto de ebullición (a presión atmosférica). El uso de temperaturas elevadas y las ventajas asociadas no sería posible si no se trabajara a presiones lo suficientemente elevadas como para mantener los **disolventes como líquidos**.
- b) El uso de presiones elevadas **facilita las extracciones** de muestras en las que los analitos han quedado atrapados en los poros de la matriz. Al aplicar presión, se fuerza al disolvente hacia zonas de las matrices que, de otra manera (trabajando a presión atmosférica), no entrarían en contacto con los disolventes.
- c) Los flujos presurizados también ayudan en la **solubilización** de burbujas de aire de manera que el disolvente puede entrar en contacto más rápidamente con la matriz de la muestra. Es decir, si una burbuja de aire tuviera sellada la entrada a un poro, los disolventes no se pondrían en contacto con los analitos y no se realizaría la extracción. Sin embargo, al utilizar presiones elevadas, se fuerza al disolvente a penetrar en dichos poros e interaccionar con los analitos.

4.3 INSTRUMENTACIÓN

En la Figura I.4.2 se muestra un esquema de un instrumento de PSE. La mayoría de las aplicaciones publicadas utilizan el equipo comercializado por **Dionex** (ASE 200) que permite trabajar a temperaturas de hasta 200 °C y a presiones de hasta 21 MPa, en celdas de extracción de 1, 5, 11, 22 o 33 mL. Dispone además de un carrusel en el que se pueden colocar 24 celdas y 26 viales (de 40 o 60 mL) para la recogida de los extractos. Además, hay 4 viales para recoger los residuos de las etapas de lavado. [8]

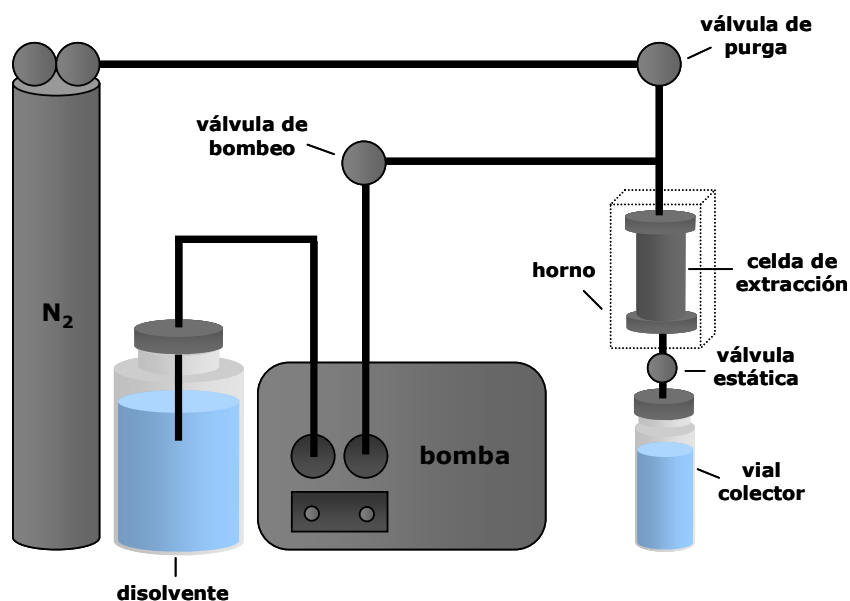


Figura I.4.2 Esquema de un sistema PSE. [9]

4.4 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Una extracción por PSE consta de una serie de **etapas** (ver Figura I.4.3) que se explican con detalle a continuación [7, 10]:

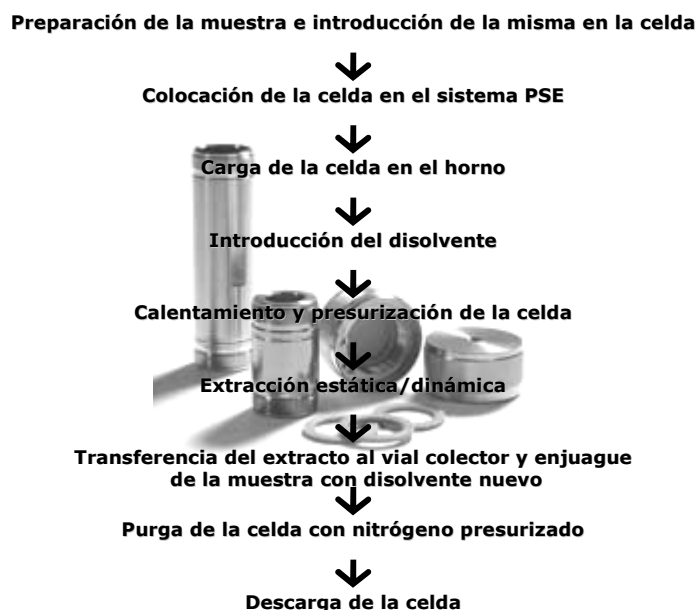


Figura I.4.3 Esquema de las etapas de una extracción por PSE. [7]

1. Antes de introducir la muestra en la celda de extracción, a menudo es necesario someterla a un **pretratamiento** consistente en la homogeneización, molienda, tamizado y secado de la misma. La difusión de los analitos desde la muestra hacia el disolvente se puede incrementar considerablemente disminuyendo el **tamaño de partícula**. Por otro lado, el **secado** de la muestra también es importante puesto que si las partículas de la muestra estuviesen rodeadas de una película de agua no se produciría un contacto adecuado entre los analitos y el disolvente, lo cual provocaría una disminución en la eficacia de la extracción. El secado es especialmente importante cuando se trabaja con disolventes no-polares, y habitualmente se recurre a la adición de un **agente desecante** (sulfato sódico anhidro [11], tierra de diatomeas [12] o Celita [13]) en la celda de extracción. En ocasiones, estas sustancias también se emplean para reducir el **volumen muerto** de la celda [14, 15], aunque también es habitual utilizar **arena** para este fin [16, 17]. Otra alternativa que también se utiliza con frecuencia para el secado de las muestras es la **liofilización** [12], aunque esta opción no es recomendable cuando el objetivo es extraer analitos volátiles. El uso de **disolventes más**

polares (acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, etc.) o de **mezclas de disolventes** (hexano/acetona, hexano/acetonitrilo, etc.) son buenas opciones para la extracción de muestras húmedas, haciendo que la etapa de secado de la muestra no sea crucial. Sin embargo, aún cuando se elija correctamente el agente desecante, en ocasiones se puede co-extraer cierta cantidad de agua que pudiera interferir en las siguientes etapas (limpieza, concentración del extracto, análisis directo). En este caso, algunos autores han recurrido a la adición directa de sulfato sódico anhidro al extracto [18]. La agregación de las partículas de muestra también puede perjudicar a la eficacia de la extracción, por eso a menudo es necesaria la **dispersión de la muestra** con un material inerte (p.ej. tierra de diatomeas, arena) [12, 19].

2. Una vez pesada, la muestra se coloca en la celda de extracción. Para evitar que se atasquen las fritas metálicas presentes en ambos extremos de las celdas de extracción, éstas puede cubrirse con **filtros** de celulosa [3, 14, 15, 17, 20] o de fibra de vidrio [21], o con una pequeña cantidad de Celita [22]. Como ya se adelantó antes, también es recomendable rellenar el **volumen muerto** de la celda con matrices inertes [1].
3. Se puede operar en dos modos: pre-calentamiento (**preheat**) o pre-llenado (**prefill**). En el primer caso, el horno se calienta hasta la temperatura apropiada y, a continuación, la celda se carga en el horno. Transcurrido el tiempo pertinente, el disolvente se introduce en la celda y el proceso de extracción comienza. En el segundo caso, la celda se llena con el disolvente y solo después se carga en el horno. El modo de pre-llenado permite la eliminación de aire intersticial y evita la degradación de compuestos fácilmente oxidables. Por este motivo, también se aconseja desgasificar a los disolventes antes de la extracción. Este modo de pre-llenado es recomendable para la extracción de compuestos termolábiles.
4. El proceso de extracción puede realizarse en modo estático o en modo dinámico. El **modo estático** comienza calentando la celda con la muestra hasta una temperatura apropiada durante un tiempo de equilibrio (aproximadamente 5 min) y viene seguido del proceso de extracción estático.

Este proceso se puede repetir varias veces si en una sola etapa se obtienen bajas recuperaciones. El **modo dinámico** se puede asimilar a la HPLC llevada a cabo a temperaturas elevadas, en donde el empaquetamiento de la columna se reemplaza por la muestra. Aunque de esta manera se mejora la transferencia de masa, este tipo de extracción apenas se utiliza, principalmente debido al elevado consumo de disolvente en comparación con el modo estático.

5. Tras la extracción, el extracto se transfiere al vial colector y la muestra y los tubos conectores se enjuagan con varias porciones de disolvente nuevo (**flush**). A continuación todo el sistema se **purga con nitrógeno presurizado** (1-2 min). El objetivo de estos dos pasos es, por una parte, el de eliminar en la medida de lo posible todos los residuos de la muestra para así mejorar la recuperación del analito y, por otra parte, el de preparar al sistema para el siguiente proceso de extracción. [7]

4.5 PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA EFICACIA DEL PROCESO

4.5.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La **temperatura** es el parámetro más importante de los utilizados en PSE. Su efecto ya se ha explicado con profundidad en la sección anterior. Cuando se desarrolla un nuevo método, se suele comenzar trabajando a 100 °C o, si los analitos tienen un punto de degradación térmica conocido, se suele comenzar a 20 °C por debajo de dicho nivel. La mayoría de las aplicaciones de PSE operan en el rango de 75 a 125 °C, siendo **100 °C** la temperatura estándar para todas las aplicaciones medioambientales, excepto para las dioxinas. [23]

4.5.2 PRESIÓN

Como ya se ha explicado antes, el principal motivo de trabajar a **presiones elevadas** es el de mantener los **disolventes en estado líquido** cuando se encuentran a temperaturas por encima de sus puntos de ebullición y el de hacer que los fluidos se

muevan rápidamente a través del sistema. En general, los cambios en la presión de trabajo tienen un **impacto muy pequeño** en las recuperaciones y, por tanto, no se considera un parámetro experimental crítico. La mayoría de las extracciones se llevan a cabo a presiones entre 1000 psi (7 MPa) y 2000 psi (14 MPa), siendo **1500 psi** (10 MPa) la presión estándar [23]. Sin embargo, en aplicaciones con muestras húmedas o matrices muy adsorbentes una presión alta puede mejorar la eficacia de la PSE forzando la entrada del disolvente orgánico en los poros de la matriz [24].

4.5.3 DISOLVENTE

Para conseguir una extracción eficiente, lo ideal es que el disolvente **solubilice** a los analitos dejando intacta la matriz de la muestra. Para ello, la polaridad del disolvente de extracción debe ser similar a la de los compuestos a extraer. Cuando se quiere extraer un amplio rango de clases de compuestos se suele recurrir a la **mezcla de disolventes** de diferente polaridad. Además, se debe tener en cuenta la compatibilidad con las técnicas analíticas posteriores a la extracción, la necesidad de la concentración del extracto (volatilidad del disolvente), así como el coste del disolvente [23]. En PSE se pueden utilizar una gran variedad de disolventes, excepto aquellos con una temperatura de autoignición entre 40-200°C (p.ej. disulfuro de carbono, éter dietílico, 1,4-dioxano). Además, las bases y los ácidos fuertes también se deben evitar puesto que son corrosivos [8].

En general, la transferencia de las condiciones de extracción desde los métodos convencionales a PSE no requiere del cambio de disolvente; es más, PSE permite incluso el uso de disolventes que no son efectivos en los métodos convencionales. No obstante, la extracción de muestras sólidas medioambientales (suelos, sedimentos, etc.), que consisten en mezclas complejas de diferentes especies y a diferentes niveles de concentración, es una tarea complicada. Y es que a presiones y temperaturas elevadas el proceso de extracción transcurre más rápidamente; pero la selectividad disminuye puesto que no sólo se solubilizan los analitos, sino que también puede conducir a la solubilización de otros componentes de la matriz que, de tratarse de una extracción convencional, permanecerían insolubles. Por ello, a menudo, en las extracciones por PSE de muestras medioambientales, entre otras, es **difícil** conseguir una buena **selectividad**. [7]

4.5.4 NÚMERO DE CICLOS

El uso de ciclos estáticos se desarrolló para introducir **disolvente nuevo** durante el proceso de extracción, lo cual ayuda a mantener un equilibrio de extracción favorable. Se ha comprobado que las extracciones de varios ciclos son especialmente útiles para muestras con una elevada concentración de los analitos o para matrices de difícil penetración. [23]

4.5.5 TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Los tiempos de extracción en PSE son muy cortos en comparación con los de las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido. A menudo **5 min** son suficientes, tal y como se recomienda en el método EPA 3545 [6]. En ciertas matrices, los analitos pueden estar retenidos dentro de los poros u otras estructuras. En estos casos, el incremento del tiempo de extracción puede permitir la difusión de estos compuestos hacia el disolvente de extracción. El efecto del tiempo de extracción siempre se debe evaluar en conjunción con el **número de ciclos**, con el objetivo de conseguir una extracción completa de la forma más eficiente posible. [23]

4.6 ETAPAS DE LIMPIEZA

Aún cuando se lleva a cabo una buena optimización de los parámetros de extracción con el objetivo de conseguir un método de PSE selectivo, otros componentes de la matriz de elevado peso molecular (lípidos, pigmentos, resinas, etc.) pueden estar presentes en el extracto. Estos componentes deben ser eliminados antes del análisis final, para así minimizar los efectos adversos en la detección de los compuestos de interés.

Para la eliminación de dichos **compuestos interferentes** se han desarrollado diferentes **procedimientos de limpieza**. A menudo, estas interferencias se eliminan en etapas de limpieza posteriores a la extracción, siendo los procedimientos más comunes aquellos que incluyen el uso de **columnas de adsorción** o de la **cromatografía de permeación en gel (GPC)**. Tradicionalmente, las **columnas de**

adsorción con alúmina [25], sílica gel [20], carbón no-poroso grafitizado [26] y Florisil [27] se han aplicado a muestras grasas en las que es necesario eliminar los lípidos co-extraídos. Para la eliminación destructiva de lípidos y de otros compuestos oxidables de muestras alimentarias y biológicas, también se han empleado columnas de sílica gel impregnadas de ácido sulfúrico [28]. Sin embargo, la **GPC** es cada vez más popular [12, 20], principalmente porque se puede automatizar con facilidad. No obstante, la limpieza de muestras grasas es a menudo muy tediosa y larga y, en ocasiones, es necesaria más de una etapa para conseguir la eliminación de los lípidos (p.ej. GPC y columnas de sílica [14, 20], columnas de sílica gel impregnadas con ácido sulfúrico y columnas de alúmina [29], etc.).

Con el objetivo de evitar la limpieza exhaustiva de los extractos previa al análisis y de incrementar las posibilidades de automatización, también se han desarrollado procedimientos de **limpieza *in situ***. En estos casos, la selectividad de la PSE se puede mejorar añadiendo un adsorbente apropiado a la celda de extracción, para llevar así a cabo una etapa simultánea de limpieza. Así, en el caso de muestras grasas, la eliminación *in situ* de los lípidos se puede conseguir añadiendo a las celdas adsorbentes como Florisil [30], alúmina [31] o sílica gel impregnada con ácido sulfúrico [28]; de esta manera se evita que los lípidos y otros materiales co-extractables lleguen al extracto. Dicho planteamiento incrementa la velocidad de preparación de la muestra eliminando, virtualmente, la necesidad de una etapa posterior de limpieza de los extractos y reduciendo el consumo total de disolvente [24].

Cuando el objetivo es la extracción de especies polares, otra manera de minimizar la co-elución de interferencias de la matriz consiste en la aplicación de una PSE previa con un **disolvente no-polar** para así eliminar los compuestos hidrofóbicos presentes en la muestra (grasas, resinas, aceites, clorofilas, etc.) antes de la extracción de los compuestos de interés [31, 32].

4.7 APLICACIONES DE LA PSE AL ANÁLISIS DE PESTICIDAS

Originalmente, el uso de la PSE se centró en la extracción de contaminantes ambientales presentes en **suelos, sedimentos y residuos sólidos**. Sin embargo,

más recientemente, las ventajas de esta técnica se han explotado en otras áreas como son el análisis de **muestras biológicas y alimentarias**. Además, existen múltiples aplicaciones de la PSE en la determinación de pesticidas, puesto que esta técnica permite la extracción simultánea de pesticidas con polaridades muy diferentes.

4.7.1 ANÁLISIS DE SUELOS, SEDIMENTOS Y LODOS

La mayoría de los métodos de PSE desarrollados para la determinación de pesticidas en **suelos** [4, 5, 11, 21, 33-41], **sedimentos** [42-44] y **residuos sólidos** [45-47] requieren el secado, la homogeneización y, en algunos casos, el tamizado de la muestra. Tal y como se mencionó antes, la reducción del tamaño de partícula puede contribuir a una mayor eficacia de la extracción como consecuencia del mejor contacto entre el disolvente y las partículas de la muestra. No obstante, la necesidad de pulverizar la muestra para obtener una muestra representativa está principalmente determinada por el tamaño de muestra utilizado en los experimentos. En general, se manejan tamaños de 1-2 g para el caso de muestras de polvo o ceniza, y de 1-5 g para suelos y sedimentos. Sin embargo, también se han publicado procedimientos en los que se manejan cantidades mayores (10-20 g) [4, 34, 41, 42] o menores (0,2 g) [5].

Para conseguir extractos libres de interferencias se ha recurrido tanto a procedimientos de **limpieza a posteriori** mediante SPE [38, 40, 44], como a **limpiezas in situ** incorporando determinados adsorbentes en celda como por ejemplo Florisil [37] o alúmina [43]. En ocasiones, la introducción de adsorbentes en la celda no ha sido suficiente y se ha necesitado una etapa de limpieza adicional (p. ej. SPE con Florisil [4]). También se han publicado trabajos en los que los extractos de muestras sólidas medioambientales se han purificado utilizando dos etapas de limpieza a posteriori (GPC y SPE [42], partición del extracto PSE con hexano y dSPE [47]).

4.7.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y ALIMENTARIAS

La PSE se ha aplicado tanto a **muestras vegetales** [3, 15-18, 20, 48-55] como a **muestras de tejidos animales** [12, 14, 27, 56, 57]. Al igual que se ha observado para el caso de las muestras sólidas medioambientales, en general se requiere el

secado y la homogeneización de la muestra. Los residuos de pesticidas están a menudo presentes en **alimentos no-grasos**, como **fruta**, **verduras** o alimentos basados en **cereales**, que presentan un contenido de agua medio o alto. En general, el secado de estas muestras se lleva a cabo mediante la adición directa de un agente de secado como el sulfato sólido, la tierra de diatomeas o la celulosa. En determinadas aplicaciones, la extracción de pesticidas mediante PSE empleando **agua** como disolvente también es una opción apropiada [54, 55].

El problema de la **co-extracción de interferencias**, que puede dar lugar a la obtención de extractos turbios o ligeramente coloreados, se ha solventado incorporando procedimientos de limpieza a posteriori que a menudo también sirven como **etapas de preconcentración** de los analitos como la extracción líquido-líquido (**LLE**) [55], la cromatografía de permeación en gel (**GPC**) [3, 50], la extracción en fase sólida (**SPE**) [27, 54], la microextracción en fase sólida (**SPME**) [53, 57], o la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (*stir-bar sorptive extraction*, **SBSE**) [53]. Por otro lado, también se han utilizado procedimientos de **limpieza in situ** [49, 58].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Richter, B.E.; Jones, B.A.; Ezzell, J.L.; Porter, N.L. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1033-1039.
- [2] Mendiola, J.A.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1152, 234-246.
- [3] Gfrerer, M.; Chen, S.; Lankmayr E.P.; Quan, X.; Yang, F. Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 1861-1867.
- [4] Wang, W.; Meng, B.; Lu, X.; Liu, Y.; Tao, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 602, 211-222.

- [5] Zuloaga, O.; Etxebarría, N.; Fernández L.A.; Madariaga, J.M. Optimization and comparison of MAE, ASE and Soxhlet extraction for the determination of HCH isomers in soil samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 367, 733-737.
- [6] EPA Method 3545, Pressurised Fluid Extraction. En *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*, 3rd ed., Final Update IV; EPA SW-846; U.S. GPO, Washington, DC, **2008**.
- [7] Giergielewicz-Możajska, H.; Dąbrowski, Ł.; Namieśnik, J. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-Some aspects of theory and practice. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, 31, 149-165.
- [8] ASE 200, Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual, DIONEX Corp., Document No. 031149, Revision 03, Sunnyvale, **1997**.
- [9] Björklund E., Nilsson T. Pressurized liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 434-445.
- [10] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Hernández-Méndez, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1089, 1-17.
- [11] Fisher, J.A.; Scarlett, M.J.; Stott, A.D. Accelerated solvent extraction: an evaluation for screening of soils for selected U.S. EPA semivolatile organic priority pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 1120-1127.
- [12] Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L.; Cruz Sicilia, A.D.; González Rodríguez, M.J.; Plaza Bolaños, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 558, 42-52.
- [13] Pang, G.-F.; Liu, Y.-M. ; Fan, C.-L.; Zhang, J.-J.; Cao, Y.-Z.; Li, X.-M.; Li, Z.-Y.; Wu, Y.-P. ; Guo, T.-T. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 1366-1408.
- [14] Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C.D.; Davis, M.D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D.G. Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis. *Chemosphere* **2004**, 57, 373-381.

- [15] El-Nagar, Kh.; Shehata, A.B.; Schantz, M.; Porter, B. Extraction of residual chlorinated pesticides from cotton matrix as part of a certification method for cotton reference material. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **2005**, 44, 1257-1267.
- [16] Adou, K.; Bontoyan, W.R.; Sweeney, P.J. Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49, 4153-4160.
- [17] Cho, S.-K.; Abd El-Aty, A.M.; Park, Y.-S.; Choi, J.-H.; Khay, S.; Kang, C.-A.; Park, B.-J.; Kim, S.-J.; Shim, J.-H. A multiresidue method for the analysis of pesticide residues in polished rice (*Oryza sativa* L.) using accelerated solvent extraction and gas chromatography and confirmation by mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2007**, 21, 602-609.
- [18] Fernández-Moreno, J.L.; Arrebola Liébanas, F.J.; Garrido-Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1111, 97-105.
- [19] Kot-Wasik, A.; Wasik, A. Determination of robenidine in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 543, 46-51.
- [20] Chen, S.; Gfrerer, M.; Lankmayr, E.; Quan, X.; Yang, F. Optimization of accelerated solvent extraction for the determination of chlorinated pesticides from animal feed. *Chromatographia* **2003**, 58, 631-636.
- [21] Hussen, A.; Westbom, R.; Megersa, N.; Mathiasson, L.; Björklund, E. Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1152, 247-253.
- [22] Dean, J.R.; Santamaria-Rekondo, E.; Ludkin, E. Accelerated solvent extraction of phenols from soil. *Anal. Commun.* **1996**, 33, 413-416.
- [23] Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction (ASE®), Technical Note 208, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, **2004**.
- [24] Ramos, L.; Kristenson, E.M.; Brinkman, U.A.T. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* **2002**, 975, 3-29.
- [25] Wilga, J.; Kot-Wasik, A.; Namieśnik, J. Comparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples. *Talanta* **2007**, 73, 812-819.

- [26] Syhre, M.; Hanschmann, G.; Heber, R. Cleanup procedure for monitoring chlorinated compounds in animal feed and crops. *J. AOAC Int.* **1998**, 81, 513-517.
- [27] Argauer, R.J.; Lehotay, S.J.; Brown, R.T. Determining lipophilic pyrethroids and chlorinated hydrocarbons in fortified ground beef using ion-trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3936-3939.
- [28] Sporning, S.; Björklund, E. Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls from fat-containing food and feed samples. Influence of cell dimensions, solvent type, temperature and flush volume. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1040, 155-161.
- [29] Extraction of PCBs from environmental samples using Accelerated Solvent Extraction (ASE[®]), Application Note 316, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, **1995**.
- [30] Gómez-Ariza, J.L.; Bujalance, M.; Giráldez, I.; Velasco, A.; Morales, E. Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. *J. Chromatogr. A* **2002**, 946, 209-219.
- [31] Draisci, R.; Marchiafava, C.; Ferretti, E.; Palleschi, L.; Catellani, G.; Anastasio, A. Evaluation of musk contamination of freshwater fish in Italy by accelerated solvent extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, 814, 187-197.
- [32] Papagiannopoulos, M.; Mellenthin, A. Automated sample preparation by pressurized liquid extraction-solid-phase extraction for the liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process. *J. Chromatogr. A* **2002**, 976, 345-348.
- [33] Westbom, R.; Hussen, A.; Megersa, N.; Retta, N.; Mathiasson, L.; Björklund, E. Assessment of organochlorine pesticide pollution in Upper Awash Ethiopian state farm soils using selective pressurized liquid extraction. *Chemosphere* **2008**, 72, 1181-1187.
- [34] Gan, J.; Papiernik, S.K.; Koskinen, W.C.; Yates, S.R. Evaluation of accelerated solvent extraction (ASE) for analysis of pesticide residues in soil. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 3249-3253.
- [35] Dragan, D.; Cucu-Man, S.; Dirtu, A.C.; Mocanu, R.; Van Vaeck, L.; Covaci, A. Occurrence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soils

- and sediments from Eastern Romania. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2006**, 15, 833-842.
- [36] Pyle, S.M.; Marcus, A.B. Rapid and sensitive determination of pesticides in environmental samples by accelerated solvent extraction and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, 897-898.
- [37] Hildebrandt, A.; Lacorte, S.; Barceló, D. Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 1459-1468.
- [38] Hussen, A.; Westbom, R.; Megersa, N.; Retta, N.; Mathiasson, L.; Björklund, E. Optimisation of pressurized liquid extraction for the determination of p,p'-DDT and p,p'-DDE in aged contaminated Ethiopian soils. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 1525-1533.
- [39] Concha-Graña, E.; Fernández-González, V.; Turnes-Carou, M.I.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. Pressurized liquid extraction of organochlorine pesticides from certified solid materials. *J. Chromatogr. Sci.* **2007**, 45, 369-374.
- [40] Concha-Graña, E.; Turnes-Carou, M.I.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Fernández-Fernández, E.; Prada-Rodríguez, D. Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1047, 147-155.
- [41] Dagnac, T.; Bristeau, S.; Jeannot, R.; Mouvet, C.; Baran, N. Determination of chloroacetanilides, triazines and phenylureas and some of their metabolites in soils by pressurized liquid extraction, GC-MS/MS, LC-MS and LC-MS/MS. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1067, 225-233.
- [42] Mekebri, A.; Crane, D.B.; Blondina, G.J.; Oros, D.R.; Rocca, J.L. Extraction and analysis methods for the determination of pyrethroid insecticides in surface water, sediments and biological tissues at environmentally relevant concentrations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, 80, 455-460.
- [43] Villaverde, J.; Hildebrandt, A.; Martínez, E.; Lacorte, S.; Morillo, E.; Maqueda, C.; Viana, P.; Barceló, D. Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. *Sci. Total Environ.* **2008**, 390, 507-513.
- [44] Dąbrowski, Ł.; Giergielewicz-Możajska, H.; Biziuk, M.; Gaca, J.; Namieśnik, J. Some aspects of the analysis of environmental pollutants in sediments using

- pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2002**, 957, 59-67.
- [45] Díaz-Cruz, M.S.; Barceló, D. Highly selective sample preparation and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of chlorpyrifos, diazinon and their major metabolites in sludge and sludge-fertilized agricultural soils. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1132, 21-27.
- [46] Popp, P.; Keil, P.; Möder, M.; Paschke, A.; Thuss, U. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. *J. Chromatogr. A* **1997**, 774, 203-211.
- [47] Kawata, K.; Asada, T.; Oikawa, K. Determination of pesticides in compost by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1090, 10-15.
- [48] Barriada-Pereira, M.; González-Castro, M.J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D.; Fernández-Fernández, E. Comparison of pressurized liquid extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta*, **2007**, 71, 1345-1351.
- [49] Tanaka, T.; Hori, T.; Asada, T.; Oikawa, K.; Kawata, K. Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for gas chromatographic-mass spectrometric determination of pesticides in green leafy vegetables. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1175, 181-186.
- [50] Obana, H.; Kikuchi, K.; Okihashi, M.; Hori, S. Determination of organophosphorus pesticides in foods using an accelerated solvent extraction system. *Analyst*, **1997**, 122, 217-220.
- [51] Calderón-Preciado, D.; Jiménez-Cartagena, C.; Peñuela, G.; Bayona, J.M. Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, in press.
- [52] Garrido Frenich, A.; Martínez Salvador, I.; Martínez Vidal, J.L.; López-López, T. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, 1106-1118.

- [53] Wennrich, L.; Popp, P.; Köller, G.; Breuste, J. Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2001**, 84, 1194-1201.
- [54] Suchan, P.; Pulkrabová, J.; Hajšlová, J.; Kocourek, V. Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 520, 193-200.
- [55] Herrera, M.C.; Prados-Rosales, R.C.; Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D. Static—dynamic pressurized hot water extraction coupled to on-line filtration—solid-phase extraction—high-performance liquid chromatography—post-column derivatization-fluorescence detection for the analysis of *N*-methylcarbamates in foods. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 463, 189-197.
- [56] Pawlowski, T.M.; Poole, C.F. Extraction of thiabendazole and carbendazim from foods using pressurized hot (subcritical) water for extraction: a feasibility study. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3124-3132.
- [57] Curren, M.S.; King, J.W. Ethanol-modified subcritical water extraction combined with solid-phase microextraction for determining atrazine in beef kidney. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2175-2180.
- [58] Mezcúa, M.; Repetti, M.R.; Agüera, A.; Ferrer, C.; García-Reyes, J.F.; Fernández-Alba, A.R. Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 1833-1840.

CAPÍTULO I.5. FOTODEGRADACIÓN

5.1 INTRODUCCIÓN

Según la IUPAC, una **reacción fotoquímica** es una reacción química provocada por **absorción de luz** ultravioleta (UV), visible (VIS), o infrarroja (IR) [1]. Dentro de las transformaciones fotoquímicas se pueden diferenciar dos tipos de procesos (Figura I.5.1): los procesos fotoquímicos directos y los sensibilizados. Los **procesos fotoquímicos directos** (fotodegradación directa) se refieren a la absorción de luz por un compuesto a las longitudes de onda que corresponden al espectro de absorción del mismo, con un flujo global de radiación de magnitud suficiente como para ocasionar una transformación química. Un **proceso fotoquímico sensibilizado** (fotodegradación indirecta) se refiere a la absorción de energía luminosa por parte de una molécula sensibilizadora intermedia. La energía luminosa absorbida se puede transferir a otros compuestos que no absorben luz o puede iniciar la producción de compuestos químicos oxidantes altamente reactivos, como el oxígeno singlete o radicales peroxi e hidroxilo, los cuales pueden reaccionar con una molécula de sustrato originando una transformación química. [2]

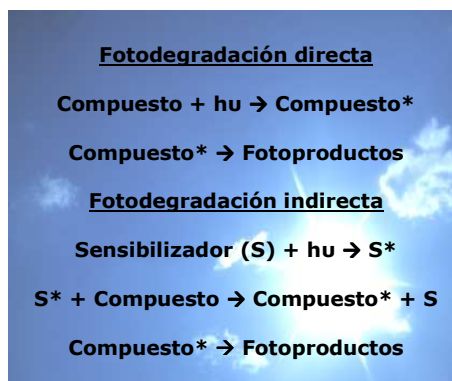


Figura I.5.1 Mecanismos de reacción de la fotodegradación directa e indirecta.

5.2 FOTODEGRADACIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE

El comportamiento y destino de los pesticidas en el **medioambiente** están controlados por procesos **biológicos, físicos y químicos** [3]. Estos procesos (Figura I.5.2) se pueden clasificar en dos grupos, dependiendo de si influyen en la:

- **persistencia del pesticida:** procesos de degradación química y biológica (biodegradación),

- **movilidad del pesticida:** adsorción, consumo por parte de las plantas (fijación, absorción), volatilización, escorrentía y filtrado. [4]

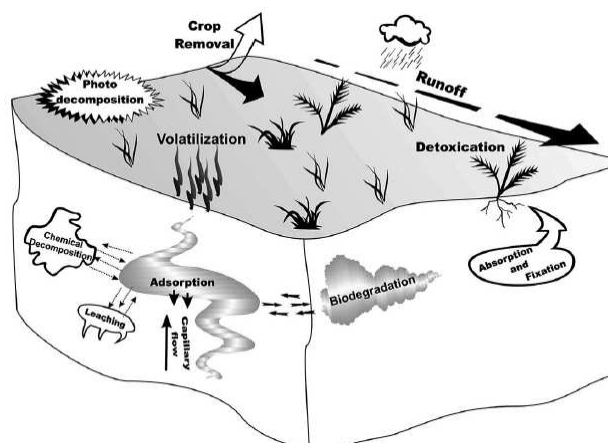


Figura I.5.2 Destino de los pesticidas en el suelo. [4]

La **biodegradación** y la **fotodegradación** son los principales procesos de degradación medioambientales. La fotodegradación puede tener lugar en la atmósfera o en la superficie del suelo o del agua. Uno de los **factores** a tener en cuenta en este tipo de procesos es la intensidad de la radiación UV que, a su vez, depende de varios factores: época del año, hora del día, latitud, altura sobre el nivel del mar, presencia de nubes, tamaño del agujero de la capa de ozono, etc. [5]

Muchos pesticidas son susceptibles a la fototransformación puesto que sus estructuras contienen frecuentemente **grupos cromóforos** que absorben luz a longitudes de onda en la región UV y visible del espectro solar. Los grupos potencialmente cromóforos incluyen a los enlaces insaturados (p. ej. $N=O$, $C=S$, $N=N$, $C=C-C=C$) y estructuras de anillos aromáticos [2]. Antes de que la fotodegradación alcance el punto final, se forman productos intermedios de degradación de los compuestos primarios. La identificación de estos **fotoproductos intermedios** es de gran importancia ya que es posible que posean una **toxicidad** para determinados seres vivos más elevada que los compuestos de los que proceden [5].

5.3 APLICACIONES TÉCNICAS DE LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN

El uso doméstico de insecticidas y la actividad industrial asociada, que afecta particularmente a países desarrollados, genera grandes cantidades de **aguas residuales**. El depósito directo de aguas residuales en los canales naturales tiene un impacto considerable en el medioambiente. Esto, junto con la necesidad de restituir esta agua para nuevos usos, hace esencial la purificación de las aguas residuales para conseguir el grado de calidad deseado [6]. Los desarrollos en el dominio del tratamiento químico del agua para su *limpieza* han conducido a una mejora de los procedimientos de degradación oxidativos de compuestos orgánicos disueltos o dispersos en el medio acuático mediante la aplicación de métodos catalíticos y fotolíticos. Éstos generalmente se conocen como **Procesos de Oxidación Avanzados** (*Advanced Oxidation Processes*, **AOPs**) [7]. En estos procesos la **radiación ultravioleta** (UV) se utiliza para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos orgánicos. La gran mayoría de las aplicaciones utilizan lámparas de mercurio de media presión, debido a su gran potencia por debajo de 300 nm. Numerosos contaminantes químicos absorben radiación UV a estas longitudes de onda y, por lo tanto, pueden experimentar una fotólisis directa eficiente. Un tratamiento alternativo es la **combinación de luz UV con peróxido de hidrógeno** lo que produce un fuerte oxidante como son los radicales hidroxilo. Este último proceso es útil cuando el contaminante de interés no posee un cromóforo adecuado o tiene un rendimiento cuántico para la fotólisis directa bajo [8].

5.4 CINÉTICA DE LOS PROCESOS DE FOTODEGRADACIÓN

Habitualmente, los procesos de degradación se pueden describir mediante **ecuaciones de primer orden** [5]. Las cinéticas de degradación de primer orden se expresan mediante la ecuación I.5.1:

$$dC/dt = -kC \text{ (ecuación I.5.1)}$$

donde C es la concentración de compuesto degradado en el tiempo t y k es la constante de velocidad de primer orden. Si se integra la ecuación I.5.1 se obtiene que:

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \text{ (ecuación I.5.2)}$$

De la ecuación I.5.2 se deduce que la concentración de compuesto es una función exponencial del tiempo de degradación. Si se aplican logaritmos a ambos lados de la ecuación I.5.2:

$$\ln C(t) = \ln C_0 - kt \text{ (ecuación I.5.3)}$$

Por lo tanto, si se está considerando la fotodegradación de un compuesto y ésta sigue una cinética de primer orden, el logaritmo neperiano de la concentración será una **función lineal** del tiempo de irradiación (ecuación I.5.3).

El **tiempo de vida media** ($t_{1/2}$) se define como el tiempo que tarda la concentración inicial de un compuesto en reducirse a la mitad de la concentración inicial. Se trata de un parámetro muy útil a la hora de comparar cinéticas de fotodegradación y, a partir de la ecuación I.5.3, se obtiene que:

$$\begin{aligned} C &= C_0 / 2 \\ \ln(C_0 / 2) &= \ln C_0 - kt_{1/2} \\ \ln C_0 - \ln 2 &= \ln C_0 - kt_{1/2} \\ t_{1/2} &= \ln 2 / k \end{aligned} \text{ (ecuación I.5.4)}$$

5.5 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO FOTOQUÍMICO DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS

En general, los **estudios de fotodegradación** se llevan a cabo en varias etapas:

1. **Irradiación de la muestra** que contiene los analitos a estudiar, habitualmente con lámparas UV, simuladores solares, o luz solar natural.

2. **Extracción de los analitos y de sus fotoproductos.** Lo normal es que las concentraciones de los productos de degradación sean muy bajas, por lo que es necesario pre-concentrar la muestra o aislar los fotoproductos, habitualmente mediante extracción líquido-líquido (LLE) [9, 10] o extracción en fase sólida (SPE) [11-13]. En algunos casos también se ha utilizado la SPME como procedimiento de extracción [9, 14-16].
3. **Determinación y análisis** del compuesto de partida y de los productos que se puedan haber formado. En la mayoría de los casos, la identificación se lleva a cabo mediante GC-MS o LC-MS.

Una de las técnicas más utilizadas en los estudios *clásicos* de fotodegradación es la **LLE**. Sin embargo, este procedimiento acarrea varias **desventajas**:

1. la **sensibilidad** no siempre es suficiente para detectar los fotoproductos que se pueden generar a concentraciones muy bajas,
2. por eso, habitualmente, se requieren **varias etapas** de pre-concentración, incrementando la duración y el tedio del análisis, así como la posibilidad de cometer errores, además
3. aumentan las posibilidades de **perder algún fotoproducto**, y
4. frecuentemente se requiere el uso de **disolventes orgánicos**, dañinos para el medioambiente y para el operador.

Con el objetivo de evitar alguna de estas desventajas, LLE ha sido reemplazada por la **SPE**. No obstante, esta metodología también implica un procedimiento multietapa; por tanto, la duración de cada análisis y la posibilidad de que se produzcan pérdidas de fotoproductos son todavía elevadas.

Algunas de estas desventajas se pueden evitar utilizando la microextracción en fase sólida (**SPME**) como técnica de extracción y preconcentración. Y es que, comparada con las técnicas de preparación de muestra tradicionales, la SPME se caracteriza por ser una alternativa rápida, sensible y económica. Además, la SPME sigue las tendencias de la *química verde* [17] puesto es un procedimiento respetuoso con el medioambiente ya que no requiere el uso de disolventes orgánicos.

5.6 FOTO-SPME

En los estudios de fotodegradación realizados en esta Tesis, se ha aplicado la **SPME** al estudio de la fotodegradación de varios piretroides, pero no sólo se ha utilizado como técnica de **extracción**, si no también como **soporte o matriz** de estos estudios.

En la **foto-SPME**, o **fotodegradación en fibra**, la irradiación se produce después de la extracción, es decir, cuando los compuestos que se pretende estudiar se encuentran absorbidos en el recubrimiento de la fibra [18]. Lo novedoso de esta idea, surgida en nuestro laboratorio de investigación, es que los fotoproductos se generan **in situ** en la propia fibra y ésta es inmediatamente insertada en el puerto de inyección del sistema cromatográfico para proceder a la determinación de los mismos. Es decir, todos los fotoproductos se generan directamente en la fibra de SPME, por lo que no son necesarias etapas posteriores de extracción y se facilita su identificación debido a los elevados factores de concentración.

Por tanto, la foto-SPME presenta una serie de **ventajas** que se enumeran a continuación:

1. no requiere el uso de disolventes orgánicos, por lo que se trata de un procedimiento **respetuoso con el medioambiente**;
2. **no se requieren etapas de extracción tediosas**, por lo que el tiempo necesario para completar el estudio de fotodegradación de una determinada sustancia se reduce drásticamente;
3. la generación de fotoproductos se produce en la propia fibra, por lo que se **minimizan las posibles pérdidas** de los mismos;
4. permite trabajar a **niveles de concentración** similares a los que se encuentran en el medioambiente gracias a la elevada pre-concentración de los compuestos orgánicos en la fibra de SPME;
5. comparada con los montajes clásicos, la irradiación de la fibra es muy **sencilla**; además, las reducidas dimensiones de la fibra facilitan los trabajos de campo.

Mediante foto-SPME, acoplada con GC-MS, es posible establecer las **cinéticas de fotodegradación** de los analitos de interés, **identificar los fotoproductos** generados y establecer las **rutras de fotodegradación** de los compuestos investigados. Además, también es posible estudiar la **evolución de los productos de degradación** con el tiempo de irradiación (cinéticas de fotoformación-fotodegradación). [18, 19]

Así, la foto-SPME ha sido aplicada con **éxito** al estudio de la fotodegradación de bifenilos policlorados (PCBs) [20, 21], pesticidas [22, 23], retardantes de llama [24-26], fragancias sintéticas [27, 28] y triclosán [29-31].

5.7 FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

En este apartado se incluye un **estudio crítico y pormenorizado** de los escasos trabajos publicados hasta el momento acerca de la fotodegradación de los piretroides investigados en esta Tesis.

Es importante destacar que la mayoría de los estudios consultados se han publicado en la década de los ochenta o a principios de los noventa. Además, no se han encontrado artículos referentes al comportamiento fotoquímico de la empentrina y de la cifenotrina, mientras que la información relativa a la fotodegradación de la transflutrina y la ciflutrina es bastante escasa.

En muchos de estos trabajos, los piretroides se irradiaron bien en disoluciones orgánicas (hexano, metanol, etc.), bien como capas finas (sobre suelo, vidrio, etc.). Posteriormente a la etapa de irradiación, se recurrió habitualmente a procedimientos analíticos tediosos (p.ej. incluyendo etapas de LLE) así como a técnicas cromatográficas poco evolucionadas, como la Cromatografía de Capa Fina (TLC).

5.7.1 INTRODUCCIÓN

Tres de las rutas principales de degradación de los **piretroides** por acción de la luz son: **ruptura del enlace éster**, **dehalogenación reductiva** e **isomerización** [32].

Los piretroides crisantemato y los análogos con grupos dihalogenovinílicos experimentan la fotoisomerización vía un **dirradical** intermedio de manera que un isómero individual puede dar lugar a la formación de mezclas isoméricas *1RS*, *3RS*, con los ya anticipados

cambios en la actividad biológica (Apartado 1.5.5.2 del Capítulo I). Además de la **isomerización**, el dirradical intermedio puede sufrir una desproporción conduciendo a la formación de un **3,3-dimetilacrilato** o ciclar tras una transposición radical formándose así una lactona (Figura I.5.3) [33].

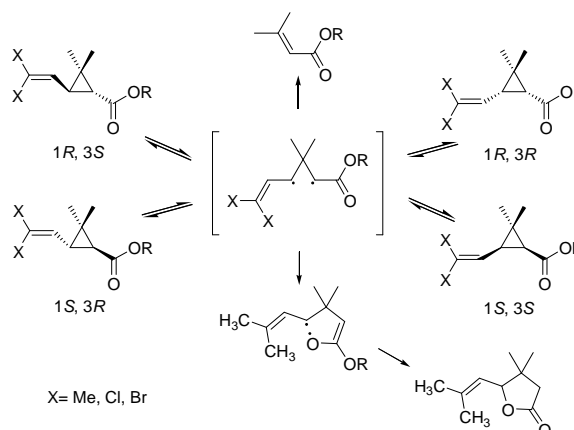


Figura I.5.3 Rutas de fotodegradación de algunos piretroides vía dirradical intermedio [33].

También se observó que los piretroides con un grupo **ciano en posición α** respecto al enlace éster (p.ej. deltametrina, fenvalerato) se fotodegradaban más rápidamente que los derivados sin dicho grupo ciano y que, al menos en disolventes orgánicos, la **decarboxilación** es una ruta importante de fotodegradación de estos compuestos. [34]

En otro estudio sobre la fotorreactividad de **seis piretroides** (*S*-bioaletrina, fenotrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina y fenvalerato) y las reacciones a 250 y 300 nm del *cis*-2,2-dimetil-3-(2,2-dihalogenovinil)-ciclopropanocarboxilato de metilo (X= Cl o Br) en varios disolventes, se apreció una diferencia de 3-10 veces entre la reactividad de la *S*-bioaletrina (que contiene el cromóforo ciclopentenolona, fuertemente absorbente) y los compuestos fenoxibencil-sustituídos. Se observó además que en los piretroides con **sustituyentes dihalogenovinílicos** el **cloro** confería una mayor fotoestabilidad que el **bromo** mientras que, a diferencia de lo publicado en [34], el

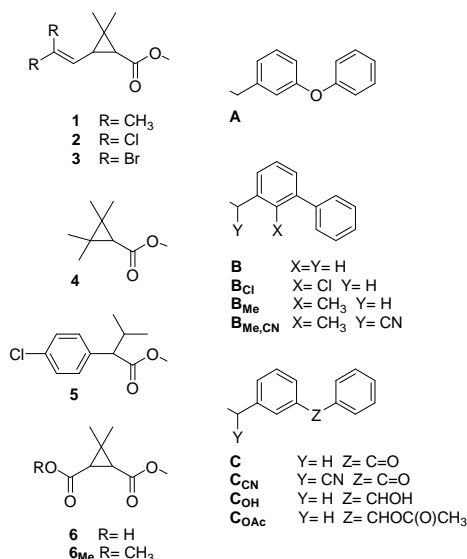


Figura I.5.4 Partes ácida y alcohol de los piretroides estudiados en [36].

grupo ciano no afectaba significativamente a la velocidad de fotodegradación [35]. Los mismos autores evaluaron la sensibilización intramolecular y la fotorreactividad de una serie de piretroides derivados de los ácidos 1-6 y de los alcoholes A-C mostrados en la Figura I.5.4 [36]. Estos estudios de fotodegradación se realizaron en disoluciones de benceno (irradiando con $\lambda < 310$ nm) y en capas finas sobre placas Petri (irradiando con luz solar). En la Figura I.5.5 se muestran las **rutas fotoquímicas** propuestas para los piretroides examinados.

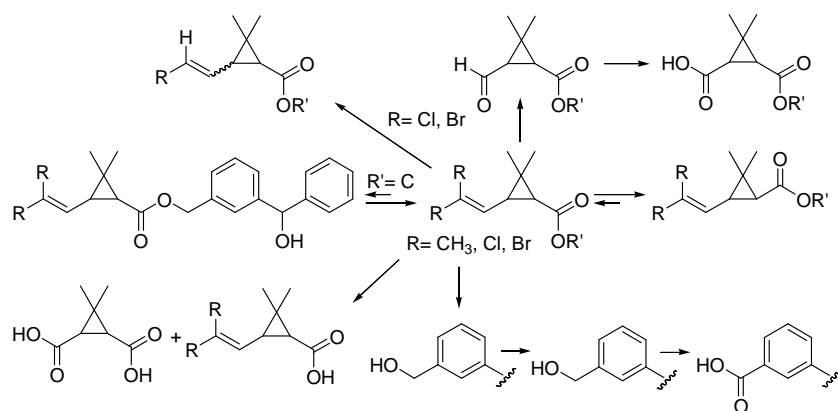


Figura I.5.5 Rutas fotoquímicas propuestas para los piretroides examinados en [36].

5.7.2 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA ALETRINA

Chen y Casida observaron que al exponer una capa fina de **trans-aletrina** sobre vidrio a una lámpara solar durante 8 horas, este piretroide se descomponía rápidamente para dar al menos **14 productos**, la mayoría de ellos ésteres. La saponificación de la mezcla de ésteres liberó **16 ácidos** (incluyendo el ácido *trans*-carbónico) y ceto

derivados resultantes del ataque oxidativo al doble enlace del grupo isobutenilo, así como derivados del ácido crisantémico en los que el grupo *trans*-metilo del isobutenilo se oxidó a alcohol, aldehído y ácido carboxílico. No apreciaron isomerización *cis-trans*, incluso tras la irradiación durante 24 horas. Para la separación y detección de los fotoproductos emplearon **TLC**. [37]

Por su parte, Ruza y col. examinaron la **fotoisomerización** y la **fotooxidación** de la **S-bioaletrina** en disolución (benceno, acetonitrilo:agua, etc.) y como capa fina sobre vidrio, bajo diferentes condiciones de irradiación (360 nm, luz solar) y en presencia o ausencia de sensibilizadores, *quenchers* y agentes de transferencia de oxígeno. Como técnicas de separación y detección emplearon Cromatografía Gas-Líquido—Detector de Captura Electrónica (**GLC-ECD**), **TLC**, Resonancia Magnética Nuclear (**NMR**) y Espectrometría de Masas con Ionización Química (**CI-MS**). Observaron que la bioaletrina (1) se descomponía rápidamente tras la exposición a la luz solar de una capa fina sobre vidrio (tras 3 horas de irradiación se descompuso un 56% del compuesto de partida). Los principales fotoproductos identificados resultaron de la **ruptura del enlace éster** (2), de la **oxidación** del metilo del grupo isobutenilo (3), de la **trasposición di-n-metano** (4, 5), de la **epoxidación** del doble enlace del grupo isobutenilo (6, 7) y de la **isomerización** *cis/trans* (8) (Figura I.5.6). La fotólisis con luz solar en disolución durante 3 horas condujo a la formación de la mayoría de los productos observados en fase sólida. La formación de ácido crisantémico (2) por **ruptura del enlace éster** fue comparable en todos los disolventes pero se incrementó en presencia de un radical bencilo. La fotólisis directa de la bioaletrina en benceno bajo radiación UV (360 nm) condujo a los fotoproductos observados tras la exposición a la luz solar, junto con cantidades traza del derivado descarboxilado, de los epóxidos *cis*, y de otros productos minoritarios. [38]

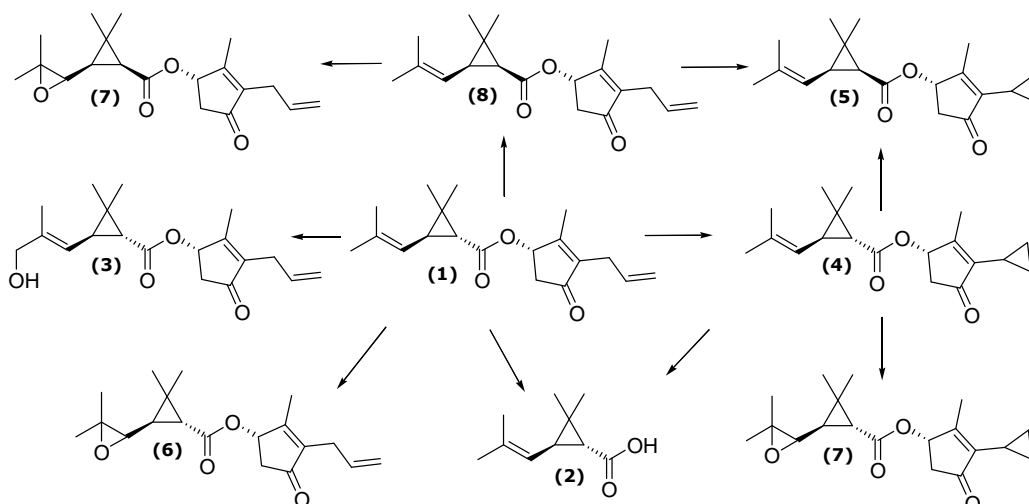


Figura I.5.6 Fotodegradación de la bioaletrina (1) según [38].

Kawano y col. expusieron a la luz solar **disoluciones de aletrina en queroseno** similares a ciertas formulaciones comerciales. Las técnicas de análisis utilizadas fueron **GC** y **GC-MS** y observaron la formación del *d-trans*-crisantemato de *d-trans*-ciclopropilretronilo como fotoproducto de la aletrina. [39]

Kimmel y col. expusieron capas finas de **aletrina** sobre placas Petri a luz solar y UV, y analizaron los fotoproductos generados utilizando técnicas cromatográficas (**TLC** y **HPLC-UV**) y espectroscópicas (**CI-MS** y **NMR**). En ambos casos obtuvieron mezclas similares de fotoproductos y observaron la conversión (0,4%) a **derivados mutagénicos potentes** (Figura I.5.7). Los bajos rendimientos obtenidos se atribuyeron, entre otros factores, a la inestabilidad de los epóxidos generados. [40]

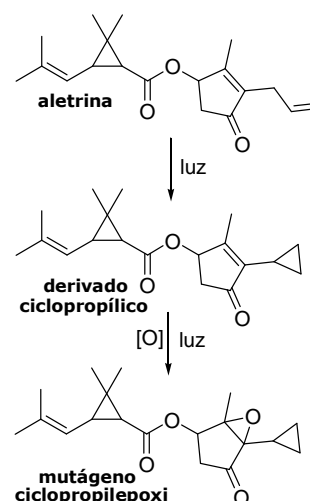


Figura I.5.7 Obtención de derivados mutagénicos por fotodegradación de la aletrina según [40].

Isobe y col. estudiaron la fotodegradación de la **aletrina** (1) utilizando **TLC**, **MS** y **NMR** como técnicas de detección. Observaron que cuando este piretroide se

aplicaba sobre una superficie de vidrio y era irradiado con una lámpara fluorescente (15 W) durante 5-7 días, o con una lámpara UV durante 1 día desde una distancia de 30 cm a 37 °C, se formaban muchos **productos polares** entre los cuales se pudieron identificar la aletrona (2) y el glioxilato de aletronilo (3) (Figura I.5.8). [41]

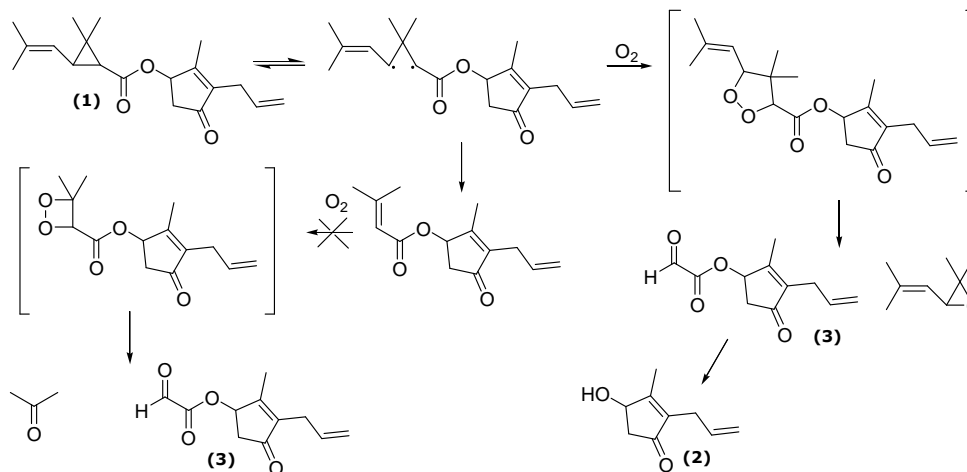


Figura I.5.8 Fotodegradación de la aletrina (1) según [41].

5.7.3 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA CIFLUTRINA

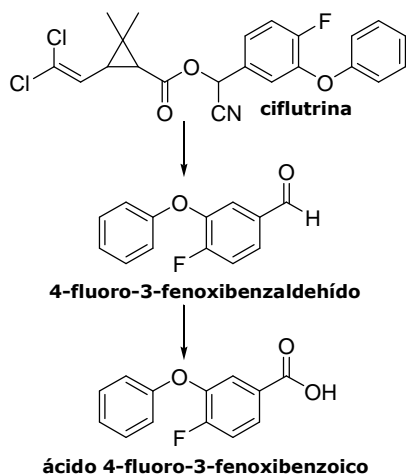


Figura I.5.9 Ruta de degradación para la fotólisis acuosa de la ciflutrina según [42].

La información disponible en la bibliografía acerca de la fotoquímica de la ciflutrina es bastante escasa, además de incompleta. Se ha publicado que la **ciflutrina** tiene una vida media de **fotólisis acuosa** relativamente corta (12,2 días a pH 7), sugiriendo que ésta es una ruta importante para su disipación. En la Figura I.5.9 se muestra la ruta de degradación propuesta para la fotólisis de este piretroide en agua. [42]

Por otro lado, se estimó una vida media de 4,5 días para la **fotólisis acuosa directa** y de 5,6 días para la **fotodegradación en suelo** bajo luz solar. En agua se detectaron los mismos fotoproductos

que los mostrados en la Figura I.5.9. En lo que respecta a la fotodegradación en suelo, el 4-fluoro-3-fenoxibenzaldehído fue el fotoproducto más importante, mientras que el 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2-amino-1-(4-fluoro-3-fenoxifenil)-2-oxoetilo, el ácido 4-fluoro-3-fenoxibenzoico y el ácido [[[3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil]carbonil]oxi]-4-fluoro-3-fenoxibencenoacético fueron productos de degradación minoritarios. [43]

5.7.4 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA CIHALOTRINA

Hall y Leahey publicaron un trabajo en el que incubaron **cihalotrina** con dos mezclas **agua/sedimento de río** contenidas en recipientes de cuarzo. Tras su exposición a la luz solar, la cihalotrina se degradó con una vida media de aproximadamente 20 días en ambas mezclas. La velocidad de degradación en la fase acuosa fue, sin embargo, mucho mayor que en el sistema agua/sedimento, lo cual se atribuyó a la adsorción de la cihalotrina al sedimento. El proceso fotoquímico más importante fue la **ruptura del enlace éster** de la molécula, aunque también se observó **fotoisomerización**. [44]

Curl y col. realizaron estudios en los que observaron que, al exponer **disoluciones acuosas** de **λ -cihalotrina** (pH 5) a la **luz solar** durante 30 días, dicho compuesto se fotodegradaba con una vida media de aproximadamente 30 días, siendo los ácidos (1*RS*)-*cis*- y (1*RS*)-*trans*-3-(*ZE*-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico y el (1*RS*)-*cis,trans*-3-(*ZE*-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (*RS*)- α -amido-3-fenoxibencilo los productos de degradación más importantes. Se apreció además la isomerización óptica y geométrica de la λ -cihalotrina [45]. En otro trabajo publicado por los mismos autores se mostró que cuando se irradiaban **capas finas de suelo** tratadas con λ -cihalotrina con un **arco de Xenon** o con **luz solar**, la vida media de este piretroide era inferior a 2 y a 30 días respectivamente. Los productos de degradación más importantes fueron el ácido (1*RS*)-*cis*-3-(*ZE*-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico y el (1*RS*)-*cis,trans*-3-(*ZE*-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (*RS*)- α -amido-3-fenoxibencilo. [46]

En otro estudio se observó una lenta degradación de la **cihalotrina** (vidas medias muy por encima de 166 horas) en **suelo** (24,8% arcilla, 4,97 % MO, pH 6,45) irradiado con

luz artificial a 25 °C. El producto de degradación más importante de los detectados fue el (1*RS*)-*cis,trans*-3-(*ZE*-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (*RS*)- α -amido-3-fenoxibencilo. [43]

Finalmente, Ruza y col. investigaron la fotodescomposición en **disolución** ($\lambda = 300$ nm) y en **fase sólida** sobre vidrio o suelo (luz solar) de la cihalotrina. Como técnicas de análisis emplearon **GC-MS**, **^{19}F NMR**, **GC-ECD** y **TLC**. Se observaron reacciones de **isomerización** *E/Z* y *cis/trans* y procesos mediados por radicales libres que condujeron a reacciones de **decarboxilación**, **ruptura del éster**, **abstracción de protón**, **reacciones con oxígeno** y **reacciones con radicales generados por el disolvente**. Se vio que se obtenían materiales decarboxilados en una proporción mucho mayor que cuando el piretroide era la cipermetrina (análogo diclorovinílico). Cualitativamente, los resultados obtenidos fueron similares en disolventes hidrocarbonados (hexano, ciclohexano, metanol), en acetonitrilo acuoso, en micelas aniónicas y catiónicas, y en superficies de vidrio y suelo. En la Figura I.5.10 se muestran las reacciones de fotólisis propuestas para la cihalotrina. [47]

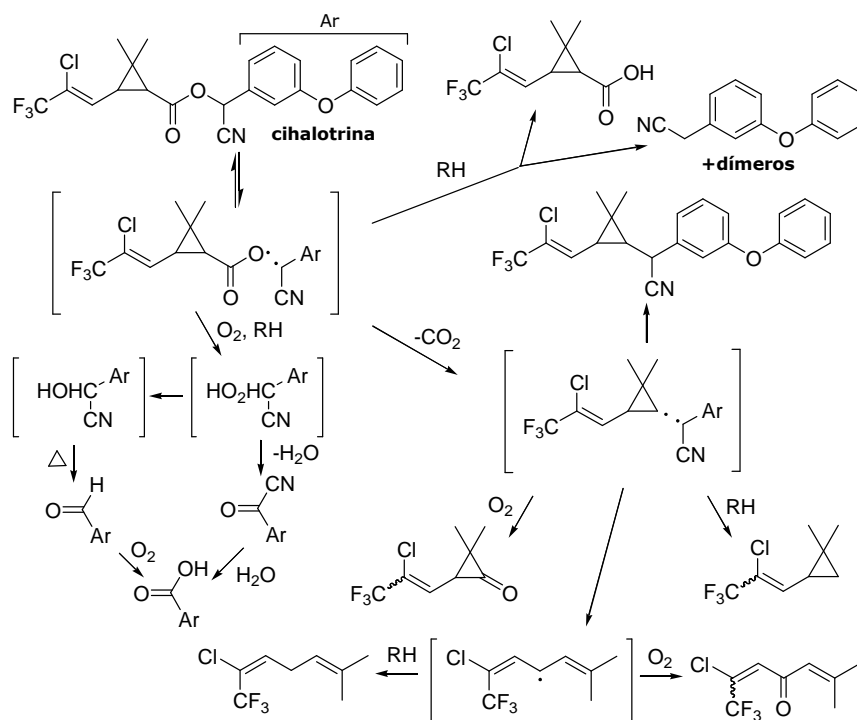


Figura I.5.10 Fotodegradación de la cihalotrina según [47].

5.7.5 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA CIPERMETRINA

Day y Leahey estudiaron los efectos de la **luz solar** durante 32 días en **disoluciones acuosas (con acetonitrilo)** de **cipermetrina**, y compararon los resultados obtenidos con los controles almacenados durante el mismo tiempo en la oscuridad. Al final del estudio, quedó alrededor de un 90% de la cipermetrina sin degradar. Seis de los ocho productos de fotodegradación separados por cromatografía se identificaron positivamente como: ácidos *cis*- y *trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico, el alcohol 3-fenoxibencílico, el aldehído y el ácido correspondientes, y el alcohol α -ciano-3-fenoxibencílico. [48]

Hall y col. investigaron la fotodegradación de la cipermetrina en la superficie del **suelo** y bajo **luz solar** durante 32 días. Estimaron una vida media de 8-16 días y detectaron los siguientes compuestos como principales fotoproductos: la **amida** análoga de la cipermetrina, los ácidos *cis*- y *trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico, y varios derivados fenoxibencílicos como el alcohol, el aldehído y el ácido. [49]

Por otra parte, Ruza estudió la fotólisis ($\lambda > 290$ nm) de la **cipermetrina** en **alcoholes, acetonitrilo acuoso y micelas de dodecil sulfato sódico**, empleando **GLC-CI-MS, TLC, NMR** e infrarrojo por transformada de Fourier (**FT-IR**) como técnicas de separación y análisis. Observó como principales rutas de fotodegradación la **isomerización**, la **ruptura del éster** y reacciones de **ruptura oxidativa** (Figura I.5.11). Concluyó también que la naturaleza de los productos obtenidos dependía de la disponibilidad de oxígeno y del disolvente utilizado. [50]

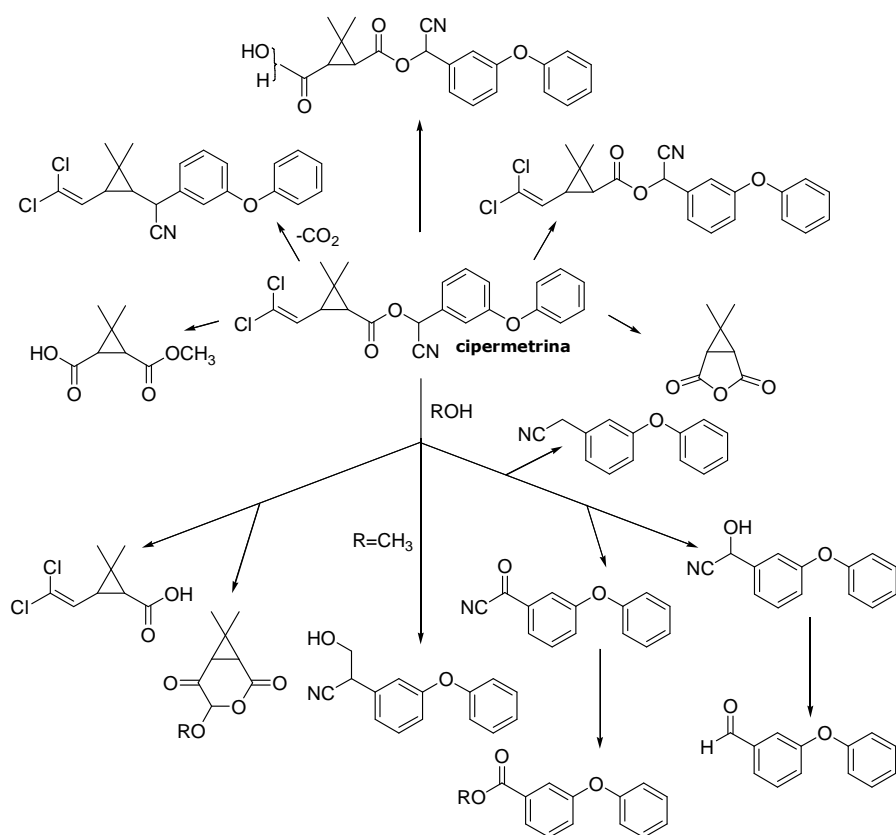


Figura I.5.11 Fotodescomposición de la cipermetrina según [50].

Takahashi y col. estudiaron los efectos de la **luz solar natural** en **disoluciones acuosas** de la [1*R*, *cis*-, α *RS*]- y de la [1*R*, *trans*-, α *RS*]-**cipermetrina**. Las disoluciones acuosas se prepararon con agua destilada, 2% acetona, ácido húmico acuoso, agua de mar o agua de río. La degradación fue más rápida en agua de río o de mar ($t_{1/2}$ del isómero *cis* = 0,6-0,7 días) que en agua destilada o en presencia de ácido húmico (2,3-2,6 días), pero la transformación más veloz tuvo lugar en presencia de acetona. Supusieron que estas diferencias se debían al efecto fotosensibilizador de la acetona o de los constituyentes orgánicos de las aguas naturales. Los principales productos de degradación fueron, además de los diferentes isómeros, el ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-diclorovinil)ciclopropanocarboxílico, el alcohol 3-fenoxibencílico junto con pequeñas cantidades del correspondiente aldehído, y dióxido de carbono. Los mismos autores observaron que la vida media de la **cipermetrina** sobre **superficies**

de suelo expuestas a la luz solar oscilaba entre 0,6 y 1,9 días, encontrando como principal fotoproducto a la amida del piretroide en cuestión. [51, 52]

Recientemente, Raikwar y Nag investigaron la fotodegradación de la **α -cipermetrina** como capa fina sobre **superficies de vidrio y suelo**. Demostraron que la fotodegradación de este piretroide bajo **luz UV y luz solar** seguía una cinética de **primer orden**. Además, utilizaron **GC-MS** para la separación e identificación de los fotoproductos [53]. Por su parte, Segal-Rosenheimery y Dubowski estudiaron la fotodegradación de **capas finas de cipermetrina** sobre cristal, bajo diferentes condiciones de irradiación (**254 nm, 310 nm y luz solar**) y bajo diferentes atmósferas. Los cambios provocados por acción de la luz se monitorizaron mediante **FT-IR y GC-MS**. Observaron que la cipermetrina se degradaba siguiendo una **cinética de primer orden** y que los rendimientos cuánticos para la fotodegradación eran de 0,41 y de 0,25 bajo 254 y 310 nm, respectivamente. El mecanismo sugerido por los autores para la fotólisis de la cipermetrina se muestra en la Figura I.5.12 [54].

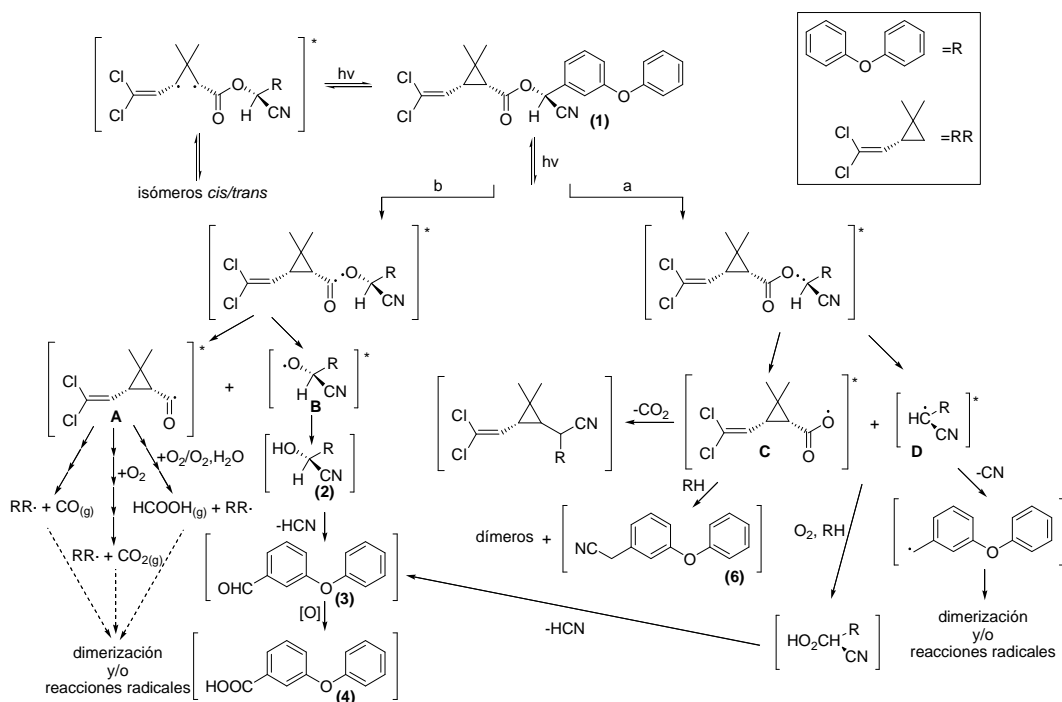


Figura I.5.12 Mecanismo sugerido por [54] para la fotólisis de la cipermetrina (1).

5.7.6 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA DELTAMETRINA

Ruzo y col. estudiaron la fotólisis de la **cis-deltametrina** en **disolución** (metanol, hexano, agua:acetonitrilo) bajo **luz UV** (290-320 nm). Los productos de degradación se aislaron mediante **TLC** y **GLC** y fueron identificados por comparación con estándares auténticos utilizando varias combinaciones de **GLC, TLC, IR, NMR** y **CI-MS**. Las **rutas de fotodegradación** propuestas en este trabajo se muestran en la Figura I.5.13. Las mezclas de fotoproductos obtenidas fueron más sencillas en hexano que en metanol. La **cis-deltametrina** (1) experimentó **isomerización, decarboxilación, y debrominación**, dando lugar a los compuestos (2), (3), y (4), respectivamente. La **ruptura del enlace éster** también fue una ruta de fotodegradación importante. En metanol y hexano, los productos más importantes derivados de la **parte ácida** del piretroide investigado fueron los ácidos (5) y (7) y, en metanol, también los metil ésteres (6) y (8). Mientras que en agua:acetonitrilo sólo se obtuvo el ácido (5). En cuanto a los compuestos (9) y (10), se obtuvieron en cantidades minoritarias. Con respecto a la **parte alcohol** de la deltametrina, en hexano y metanol se formaron (11-16). El fotoproducto mayoritario en hexano fue (17), que no se detectó en metanol. Mientras que en metanol el mayoritario fue (18), que tampoco se detectó en hexano. En acetonitrilo acuoso, el aldehído (16) y el ácido 3-fenoxibenzoico fueron los únicos fotoproductos importantes de la parte alcohol. [55]

Los mismos autores publicaron otro estudio acerca de la fotoquímica de la deltametrina en **disolución** (metanol, hexano, agua:acetonitrilo) y en **fase sólida** (como capa fina sobre vidrio o sílica gel), bajo **luz UV** (290-320 nm) y **luz solar** en el que utilizaron las mismas técnicas que las indicadas en el trabajo anterior. La Figura I.5.14 muestra las rutas de fotodegradación propuestas para el piretroide investigado. Observaron que los fotoproductos generados en disolución bajo irradiación UV surgían en general de reacciones de ruptura del enlace éster, mientras que la mayoría de aquéllos formados en fase sólida y en disolución bajo luz solar mantenían dicho enlace intacto. Sugirieron que los fotoproductos identificados podían generarse como consecuencia de cuatro procesos fotoquímicos (A-D). El proceso A implicaría la **apertura del anillo ciclopropánico** conduciendo a **isomerizaciones** o a la formación del **3,3-dimetilacrilato** (7). El proceso B involucraría la **escisión del enlace éster** oxígeno-carbono bencílico, aunque también se podrían generar fotoproductos derivados de la ruptura del éster a través del proceso D. Finalmente, el

proceso C supondría la **debromación reductiva** de la deltametrina o de los fotoproductos (9) y (11).

Bowman y Carpenter estudiaron la fotodegradación de la **deltametrina** en **disolución acuosa** a pH 5. Vieron que al exponer la disolución a luz solar artificial se inducía la degradación de la deltametrina y que el principal fotoproducto era el **ácido 3-fenoxibenzoico**. Calcularon una vida media de 47,7 días para el sistema no-sensibilizado, pero ésta se redujo a 4,03 días cuando se sensibilizó con un 1% de acetona [57]. Por otra parte, Maguire estudió la **isomerización** química y fotoquímica de la **deltametrina** mediante cromatografía líquida de alta resolución quiral-detector array de diodos (**HPLC-DAD**). Observó que en agua natural y en la oscuridad, la deltametrina (el isómero *cis*-[αS , 1*R*]) experimentaba una isomerización *cis/trans* conduciendo a la formación del isómero *cis*-[αS , 1*S*], que es inactivo hacia los ratones y los insectos. Sin embargo, vio que la irradiación con **luz solar** de la deltametrina como **capa fina** (sobre hojas de patata), en **agua natural** y en **hexano** tan sólo era una etapa parcial de detoxificación, puesto que aunque se formaban los isómeros *cis*-[αS , 1*S*] y *trans*-[αS , 1*S*] inactivos, también se formaba el isómero *trans*-[αS , 1*R*], que retiene algo de actividad hacia ratones e insectos, aunque menos que la deltametrina de partida [58].

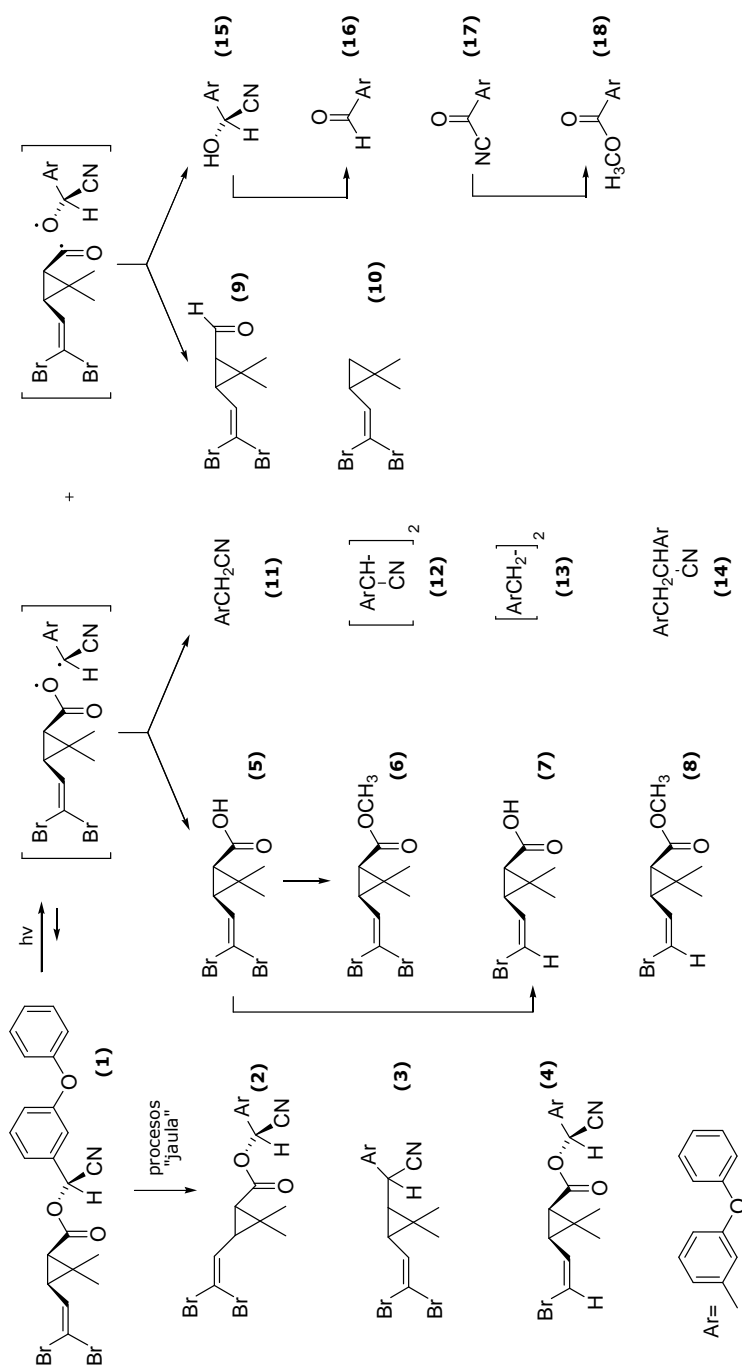


Figura I.5.13 Principales rutas de fotodegradación de la deltametrina (1) propuestas en [55].

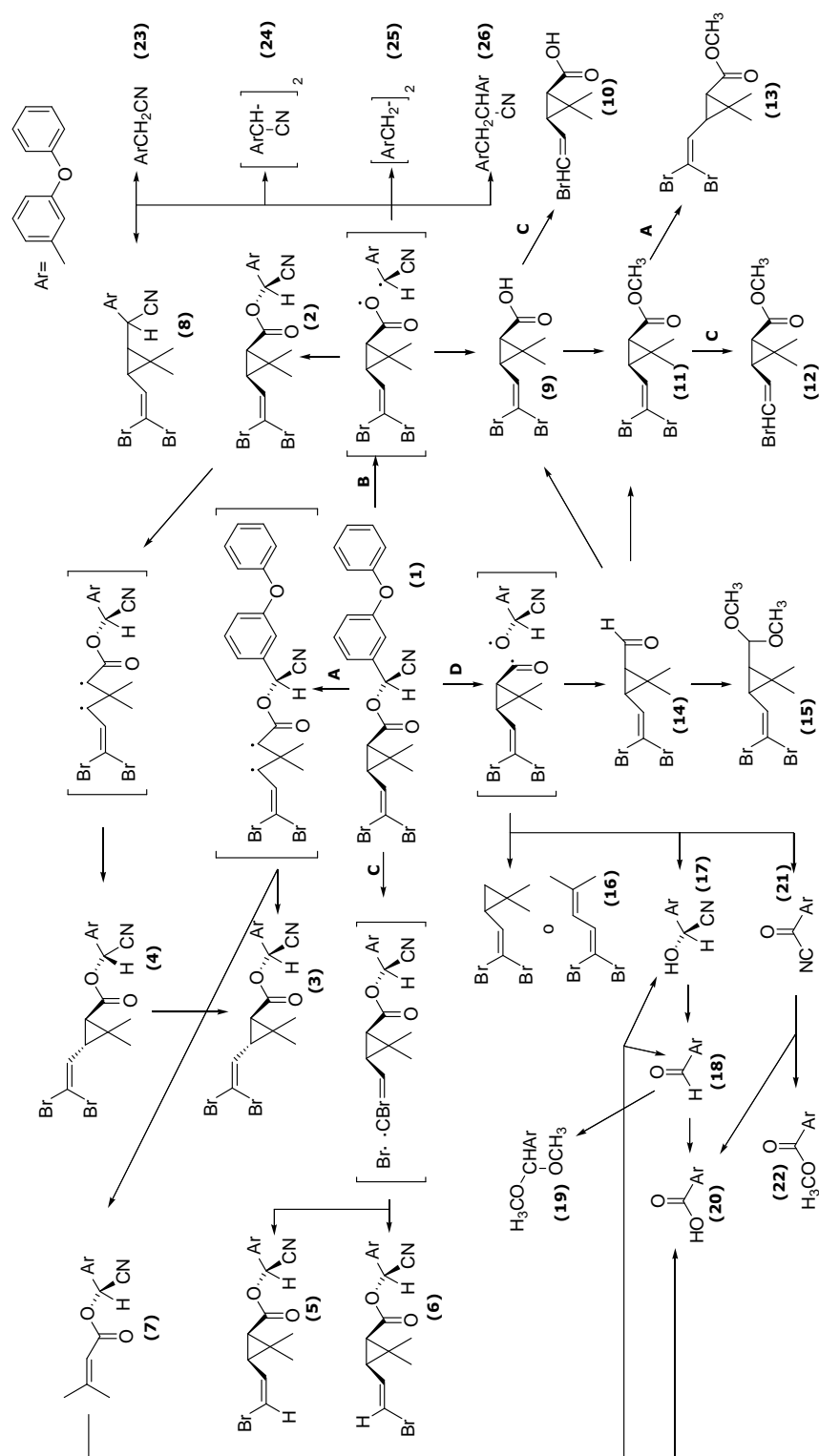


Figura I.5.14 Principales rutas de fotodegradación de la deltametrina (1) propuestas en [56].

5.7.7 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DEL FENVALERATO

Holmsted y col. estudiaron la fotólisis del **fenvalerato** (Pydrin) en varios **disolventes** (hexano, metanol, acetonitrilo:agua) bajo luz artificial ($\lambda > 290 \text{ nm}$), y como **capa fina** sobre vidrio o algodón bajo **luz solar**. Como técnicas de análisis utilizaron **GLC-MS, MS, IR, TLC** y $^1\text{H NMR}$. En la Figura I.5.15 se muestran las rutas de fotodegradación propuestas para este piretroide. El Pydrin decarboxilado (2), el compuesto (3) y el dímero (15) se detectaron en los tres disolventes. No se obtuvo como fotoproducto ningún compuesto que conservara el enlace éster, y el producto mayoritario fue el **Pydrin decarboxilado** (2). Los compuestos (4), (8), (13) y (14) se observaron sólo en hexano o metanol. El 3-fenoxibencilcianuro (9) y los dímeros (10) y (11) sólo se detectaron en hexano, mientras que el compuesto (6) sólo se encontró en metanol. Los fotoproductos que sólo se obtuvieron en acetonitrilo:agua fueron (12), (5) y (16). Finalmente, (7) y (17) no se observaron en los estudios realizados en disolución. En los experimentos realizados en capa fina se detectaron muchos de los fotoproductos identificados en disolución, pero los niveles de fotoproductos generados sobre algodón fueron muy bajos. Además, vieron que dos de los productos de degradación (4 y 9) mostraban valores de LD_{50} para los ratones de 22 y 105 mg/kg, respectivamente, y que por lo tanto eran **considerablemente más tóxicos** que el fenvalerato ($\text{LD}_{50} > 500 \text{ mg/kg}$). [59]

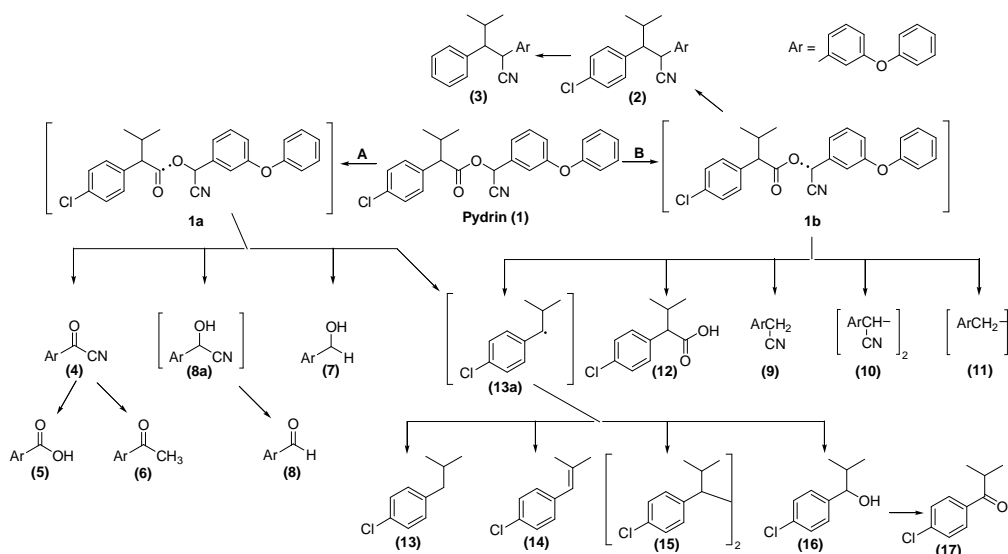


Figura I.5.15 Rutas de fotodegradación propuestas para el fenvalerato (Pydrin) según [59].

Takahashi y col. observaron que al exponer a la **luz solar** (en otoño) disoluciones de [2S, α S]-**fenvalerato** en **agua destilada**, éste se descomponía con una vida media de aproximadamente 10 días. Vieron que este piretroide se degradaba a través de diferentes rutas incluyendo la **decarboxilación**, la **hidratación** del grupo ciano (CN) a grupo carbamoilo (CONH_2), la **hidrólisis** del grupo amida (CONH_2) a grupo carboxilo (COOH) y la **ruptura del enlace éster** y del **enlace éter** del difenilo [60]. Por otro lado, Katagi y col. compararon la fotodegradación de dos isómeros del **fenvalerato**, sobre **suelo** y bajo **luz solar natural**. Ambos isómeros se descompusieron con vidas medias similares de 1,4-2,4 días y de 1,1-2,5 días. Como rutas de degradación se observaron la **hidratación** del grupo CN a grupo CONH_2 con la subsiguiente **hidrólisis** a grupo carboxilo, la **ruptura del enlace éster** y la **decarboxilación**. También se detectó la isomerización del insecticida. No se apreciaron diferencias significativas en lo que respecta a las rutas de fotodegradación entre ambos isómeros. [61]

Por otra parte, Mikami y col. estudiaron la fotodegradación del **fenvalerato** en **agua** y en **suelo**. El fenvalerato se expuso a la **luz del sol** en disoluciones muy diluidas en **agua** destilada, en acetona acuosa al 2%, en agua de río o en agua de mar, y en todos los casos se observó una rápida degradación con vidas medias de aproximadamente 4 días en verano, y de 15 días en invierno. Uno de los principales fotoproductos fue el **decarboxi-fenvalerato**, y otros productos importantes fueron el **ácido fenoxibenzoico** y el **ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico**. Además, también se detectaron pequeñas cantidades de α -carbamoil-3-fenoxibencil-2-(4-clorofenil)-3-metilbutirato (**CONH_2 -fenvalerato**), α -carboxi-3-fenoxibencil-2-(4-clorofenil)-3-metilbutirato (**COOH -fenvalerato**), 3-fenoxibencil cianuro, 3-fenoxibencilacetamida, ácido 3-fenoxifenilacético, alcohol fenoxibencílico y fenoxibenzaldehído. En el mismo trabajo se estudió también la fotodegradación del fenvalerato en **suelo** y se vio que, bajo el sol de otoño, se descomponía con una vida media de entre 2 y 18 días, en función del tipo de suelo. El principal fotoproducto fue el **CONH_2 -fenvalerato**. En pequeñas cantidades también se obtuvo el decarboxi-fenvalerato, el análogo del CONH_2 -fenvalerato sin grupo fenilo, el COOH -fenvalerato, el ácido fenoxibenzoico y el alcohol fenoxibencílico. [62]

Katagi investigó la fotodegradación del **esfenvalerato** (isómero [2S, α S] del fenvalerato) como capas finas sobre **suelo**, **arcilla** o **ácidos húmicos**, utilizando una

lámpara de Xenon ($\lambda > 300$ nm). **HPLC-UV**, **EI-MS**, y **TLC** fueron algunas de las técnicas de análisis empleadas y las rutas de fotodegradación propuestas se muestran en la Figura I.5.16. Se sugirió que quizás la **fotólisis indirecta** (reacciones con las especies de oxígeno activas) juegue un papel importante en la fotodegradación del esfenvalerato en estas superficies. Una de las rutas de fotodegradación observadas fue la **hidratación del grupo ciano** de (1) para formar (3), y otra fue la ruptura del enlace éter del grupo 3-fenoxibencilo obteniéndose (7). [63]

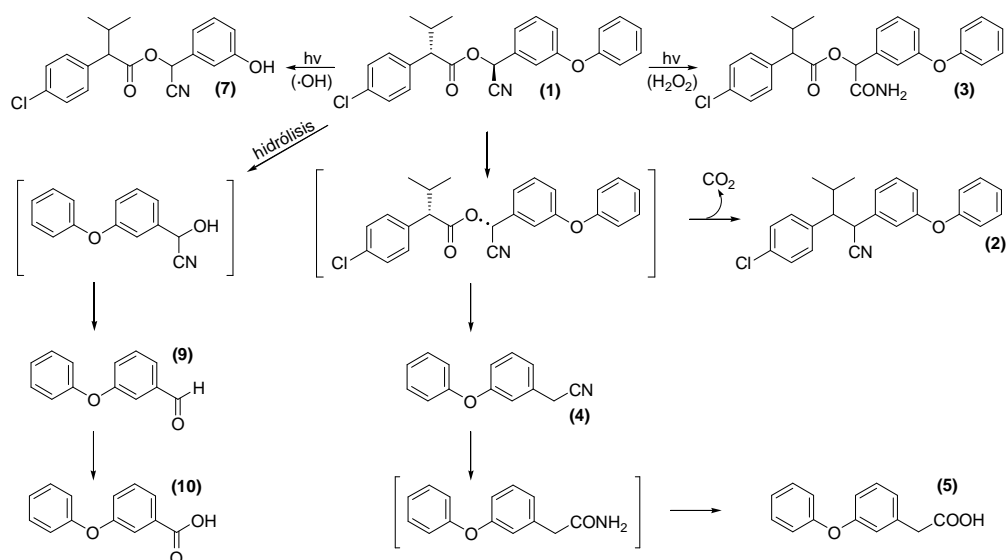


Figura I.5.16 Rutas de fotodegradación del esfenvalerato (1) según [63].

El mismo autor estudió la fotodegradación del esfenvalerato en suspensiones de arcilla bajo una lámpara de xenon ($\lambda > 290$ nm). Los fotoproductos propuestos en este trabajo se muestran en la Figura I.5.17. La **epimerización** del esfenvalerato (1) condujo a la formación del isómero (2). Una de las principales rutas de fotodegradación fue la **decarboxilación** para formar (3), lo que está apoyado por el hecho de que se detecten (8) y (11). Otra ruta importante fue la **ruptura del enlace éster** seguida de una oxidación para formar (10) y detectándose (9) como intermedio. También se detectaron la hidratación del grupo ciano a amida (4), seguida de la hidrólisis a ácido carboxílico (5), la hidroxilación en posición 4' del grupo 3-fenoxibencilo (6), y la ruptura del enlace éter para formar (7), aunque éstas fueron reacciones minoritarias. [64]

Sanjuán y col. estudiaron la fotólisis de disoluciones de **fenvalerato** en acetonitrilo y en agua (8% de metanol) utilizando lámparas de mercurio de baja presión. Detectaron la generación del fotoproducto **decarboxilado** y, mediante la fotólisis de destello láser, se demostró que la decarboxilación de este piretroide tiene lugar a través de **radicales bencilo** intermedios [65]. Por otro lado, Suzuki y Katagi examinaron la fotodegradación de disoluciones de **fenvalerato** en n-hexano, acetonitrilo, metanol, o acetonitrilo:agua (60:40), bajo una lámpara de **arco de xenon**. La identidad de los principales fotoproductos se confirmó por comparación de los tiempos de retención de **HPLC** y de los **espectros de masas** con las correspondientes sustancias de referencia. Además, utilizaron un método espectroscópico para detectar los radicales intermedios generados como consecuencia de la fotólisis del fenvalerato. Se concluyó que la **decarboxilación** es la ruta fotolítica predominante bajo las condiciones investigadas. En la Figura I.5.18 se muestran las rutas fotolíticas propuestas para el fenvalerato en este trabajo. [66]

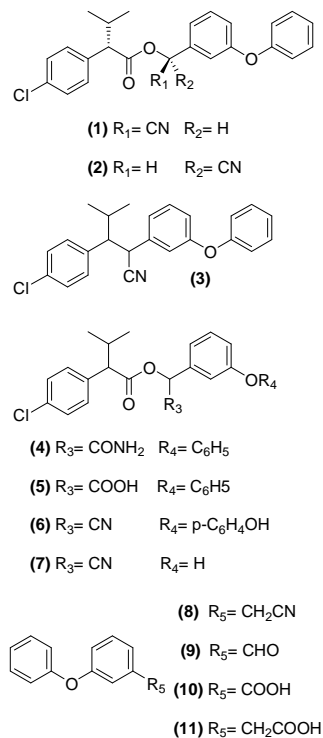


Figura I.5.17 Fotoproductos del esfenvalerato (1) según [64].

5.7.8 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DEL FLUCITRINATO

Chattopadhyaya y Dureja estudiaron la fotólisis del **flucitrinato** (1) en **disolución** (metanol) bajo luz UV (>290 nm), y como **capa fina** sobre vidrio bajo **luz UV** y también bajo **luz solar**. Como técnicas de separación y detección emplearon **TLC**, **GLC-ECD**, **MS**, **GC-MS**, **IR** y ^1H **NMR**. Las rutas fotoquímicas propuestas para este piretroide se muestran en la Figura I.5.19. En los experimentos en metanol se detectaron los fotoproductos (2)-(10). En los experimentos en capa fina bajo luz UV se detectaron (3), (5), (6), (7) y (9), mientras que bajo luz solar se detectaron (3), (5), (6), (7), (9) y (11). [67]

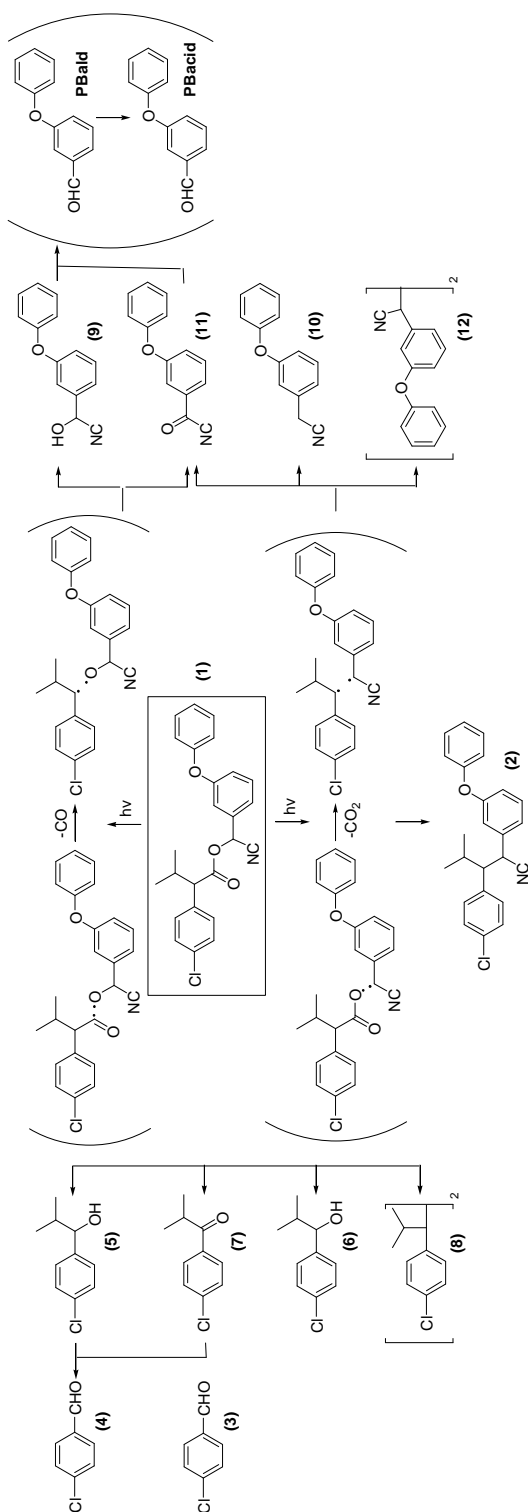


Figura I.5.18 Rutas fotolíticas propuestas para el fenvalerato (1) según [66].

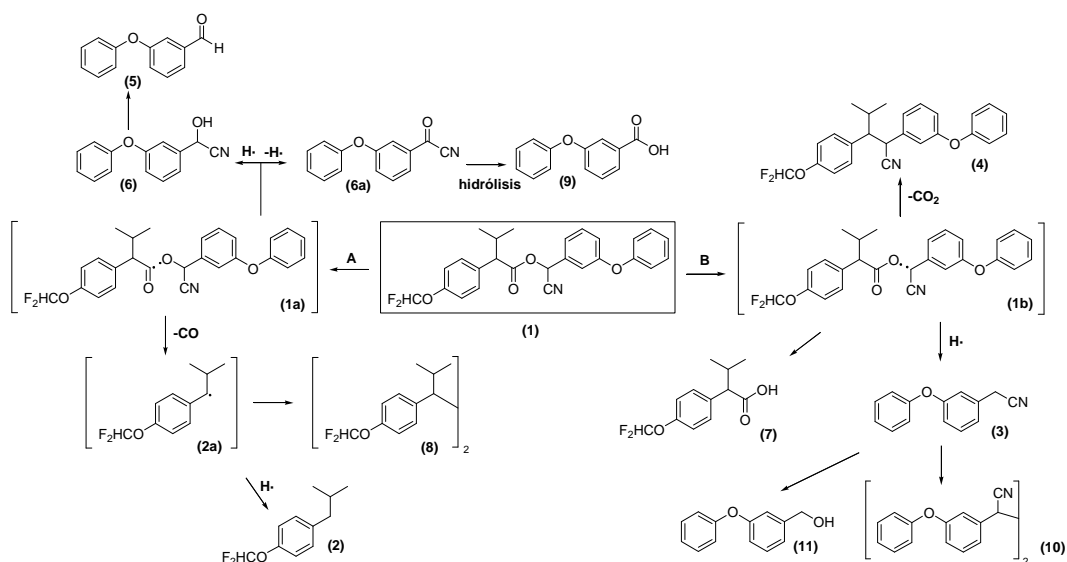


Figura I.5.19 Rutas fotoquímicas propuestas para el flucitrinato (1) según [67].

Los mismos autores estudiaron la fotólisis del **flucitrinato** en **agua** y en **suelo** bajo **luz solar natural**. Vieron que en ambos casos la fotólisis de este piretroide seguía una **cinética de primer orden**. En **agua** se detectaron cinco fotoproductos: ácido 2-(4-difluorometoxifenil)-3-metilbutanoico (7), ácido m-fenoxibenzoico (9), m-fenoxibenzaldehído (5), alcohol α -ciano-3-fenoxibencílico (6) y alcohol m-fenoxibencílico (11); mientras que en **suelo** los productos de fotodegradación fueron: (RS)- α -carbamoíl-3-fenoxibencil-(S)-2-(4-difluorometoxifenil)-3-metilbutirato, (RS)- α -carboxi-3-fenoxibencil-(S)-2-(4-difluorometoxifenil)-3-metilbutirato, ácido 2-(4-difluorometoxifenil)-3-metilbutanoico (7), m-fenoxibenzaldehído (5), alcohol m-fenoxibencílico (11) y alcohol α -carbamoíl-3-fenoxibencílico (ver algunos de estos fotoproductos en la Figura I.5.19). [68]

5.7.9 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA PERMETRINA

Holmstead y col. estudiaron la fotólisis de la [1RS, *trans*]- y de la [1RS, *cis*]-**permetrina** en **varios disolventes** (hexano, metanol, agua y agua:acetona) con luz artificial ($\lambda > 290$ nm), y en el **suelo** con **luz solar**. Utilizaron varias técnicas de separación y detección (GLC-FID, TLC, ^1H NMR, MS, GLC-MS). Al irradiar con luz UV ($\lambda = 290\text{--}320$ nm), los dos isómeros se descompusieron ligeramente más rápido en

Rawn y col. estudiaron el destino de la **permetrina** en **agua de estanque** y estimaron una vida media fotolítica bajo **luz solar** de $19,6 \pm 2,3$ horas para el isómero *trans* y de $27,1 \pm 4,4$ horas para el isómero *cis* [70]. En otro trabajo se estimó que la permetrina se degradaba con una vida media de 79,7 días en una **disolución a pH 5** a 25 °C tras la irradiación continua con una lámpara de **arco de Xenon**. Por otra parte, se determinó una vida media de más de 30 días en experimentos llevados a cabo en suelo a 25 °C bajo lámpara de Xenon, obteniéndose como productos de degradación el alcohol 3-fenoxibencílico, el ácido 3-fenoxibenzoico y otros ocho productos sin identificar. [43]

5.7.10 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA FENOTRINA

Ruzo y col. investigaron la fotodegradación de la **trans-fenotrina** (1) en una **disolución de benceno oxigenada** bajo **luz UV** (360 nm) o en una **capa fina** (0,1-0,3 mg/cm²) bajo **luz solar**. Utilizaron TLC, GLC-ECD, GLC-FID, GLC-MS, NMR y CI-MS como técnicas de separación y detección. La exposición a la luz solar condujo a la formación de los siguientes **fotoproductos** (Figura I.5.21): el epóxido (2), el alcohol (3) y el aldehído (4) derivados de la oxidación del grupo (*E*)-metilo, el caronaldehído (5) derivado de la ozonólisis, y el hidroperóxido (6) derivado de la hidroperoxidación y de la migración del doble enlace en la posición 1' del grupo isobutenilo. Además, se obtuvieron otros fotoproductos minoritarios (7 y 8) resultantes de la oxidación del hidroperóxido (6) y de la ruptura del enlace éster (9 y 10). Observaron también la oxidación del alcohol 3-fenoxibencílico (10) al correspondiente aldehído (11) y ácido carboxílico (12). En la disolución de benceno obtuvieron una distribución similar de fotoproductos. [71]

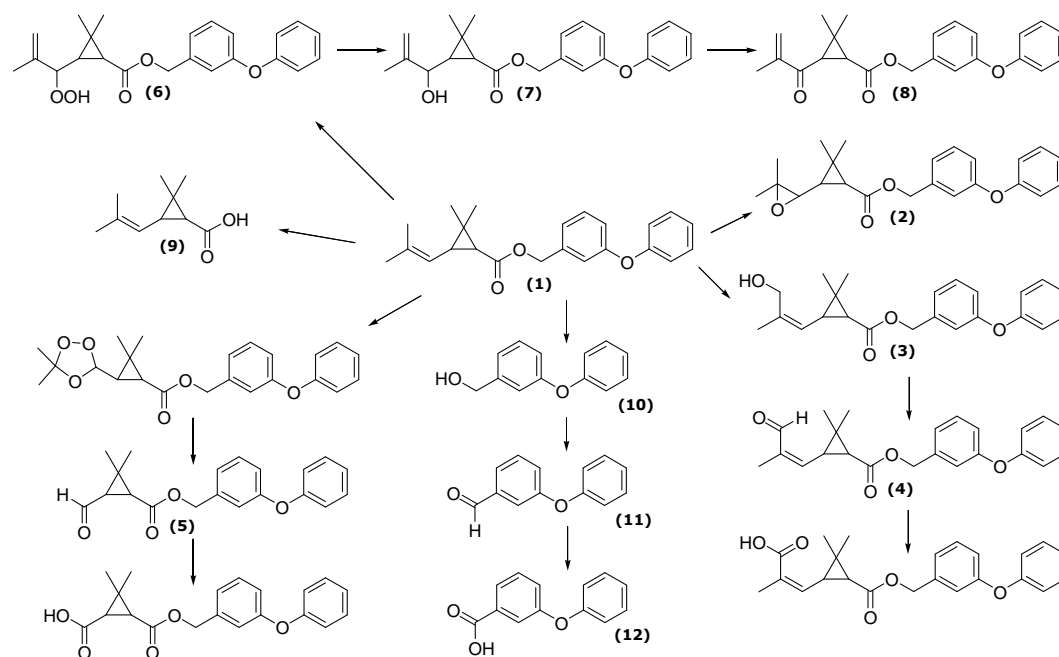


Figura I.5.21 Fotodegradación de la *trans*-fenotriner (1) según [71].

5.7.11 ESTUDIOS DE FOTODEGRADACIÓN DE LA TRANSFLUTRINA

Tan sólo se ha encontrado un único estudio acerca de la fotólisis de la **transflutrina**. En él se irradiaron **disoluciones acuosas** (2% de acetonitrilo) de este piretroide con una lámpara de vapor de mercurio ($\lambda > 290 \text{ nm}$) durante hasta 8 horas. Para la separación e identificación de los fotoproductos se utilizó **GC-MS**. Se concluyó que, bajo estas condiciones, la vida media de la transflutrina era de 17 horas y que dicha fotodegradación no se veía afectada por la presencia de ácidos húmicos. Se detectaron tres fotoproductos: el **isómero *cis* de la transflutrina** (1), un **aldehído** (2) resultante de la ruptura oxidativa del grupo diclorovinílico y un **alquino** (3) producto de la eliminación de HCl de la transflutrina (Figura I.5.22). [72]

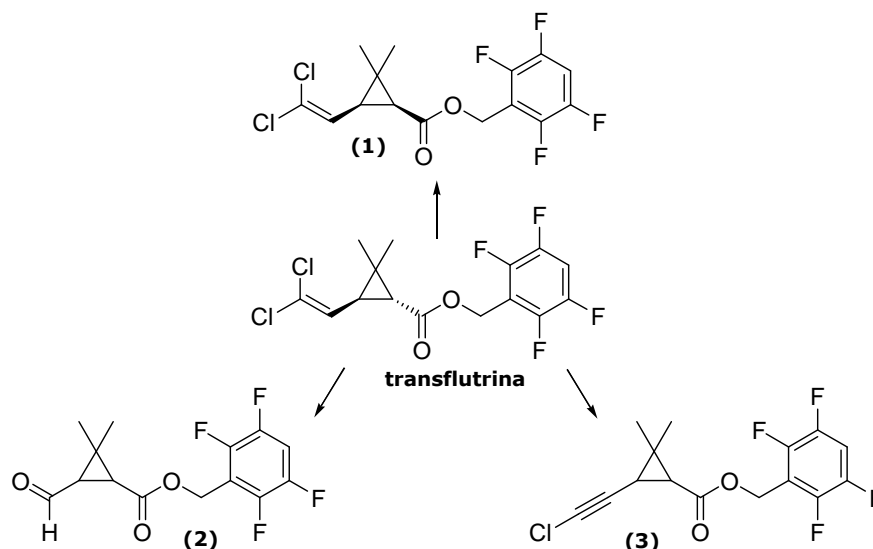


Figura I.5.22 Fotólisis de la transflutrina según [72].

5.8 FOTODEGRADACIÓN DEL BUTÓXIDO DE PIPERONILO

Fishbein y col. estudiaron la fotólisis del **PBO** empleando TLC y GLC-FID para la separación y detección de los fotoproductos. Examinaron la fotodegradación de este sinergista (grado técnico y compuesto redistilado) bajo cuatro condiciones diferentes y los resultados fueron los siguientes:

- Irradiación en platos de Pyrex abiertos en una cámara medioambiental con una **lámpara solar** (275 W, $\lambda_{\text{máx}}$ 297 nm): tras 7 días de irradiación, permaneció sin fotolizar un 95% del compuesto de partida.
- Irradiación en recipientes de borosilicato de 500 mL enfriados con agua utilizando una **lámpara de mercurio** de 450 W y con un filtro *vykor* (límite de 210 mμ, 50% transmisión a 240 mμ): tras 89 horas de irradiación de una disolución en metanol recuperaron un 96-98% del compuesto de partida.
- Irradiación en los recipientes de borosilicato utilizando la **lámpara de mercurio** de 450 W pero sin utilizar filtros: tras 5 semanas de irradiación de disoluciones de PBO (1) al 10% en ciclohexano o benceno no observaron degradación alguna. Sin embargo, al irradiar con la misma lámpara una

disolución al 10% en benceno en una celda de cuarzo durante 18 días, observaron la formación de una pequeña cantidad (2-3%) de butil carbitol (2) así como de etilenglicol (3) y propil-3,4-metilendioxitolueno (4). (Figura I.5.23)

- d) Irradiación en platos de Pyrex con **luz solar exterior**: tras 1 semana de irradiación recuperaron un 96-98% del compuesto de partida.

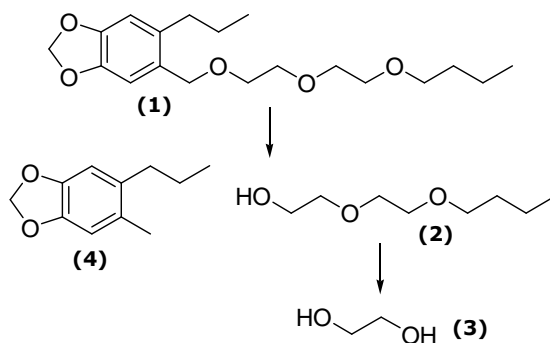


Figura I.5.23 Fotodescomposición del PBO (1) bajo las condiciones c) según [73].

De esta manera, los autores ilustraron la relativa estabilidad del PBO bajo las diferentes condiciones fotolíticas estudiadas. [73]

En otro trabajo se estudió la degradación del **PBO** en capas de 2 mm de **suelo** expuestas a luz solar artificial procedente de una **lámpara de arco de Xenon** durante 15 días (equivalente a 41 días de luz solar natural). También se incubaron controles en la oscuridad. Se observó que el PBO (1) se degradaba en presencia y en ausencia de luz con vidas medias de 1 a 3 días y que los productos de degradación formados (Figura I.5.24) derivaban de la **pérdida de la cadena lateral butoxietoxietilo** y de la **oxidación del alcohol bencílico** resultante (2) a los correspondientes aldehído (3) y ácido (4). En el suelo sin irradiar el ácido se acumuló mientras que, bajo la influencia de la luz, se degradó. Tanto en el suelo irradiado como en el control, el alcohol bencílico (2) alcanzó un pico en el tercer día [74]. En lo que respecta a la **fotólisis acuosa**, otros autores evaluaron la estabilidad del PBO en una disolución a pH 7 expuesta a la luz solar natural durante 84 horas. Se observó una rápida degradación del compuesto con una vida media de 8,4 horas, obteniéndose (2) y (3) como fotoproductos más importantes (Figura I.5.24) y al menos otros 5 productos de

degradación minoritarios [75]. En otro estudio en el que se irradió con **luz UV** también se identificó a (2), (3) y (4) como fotoproductos del PBO (Figura I.5.24). [76]

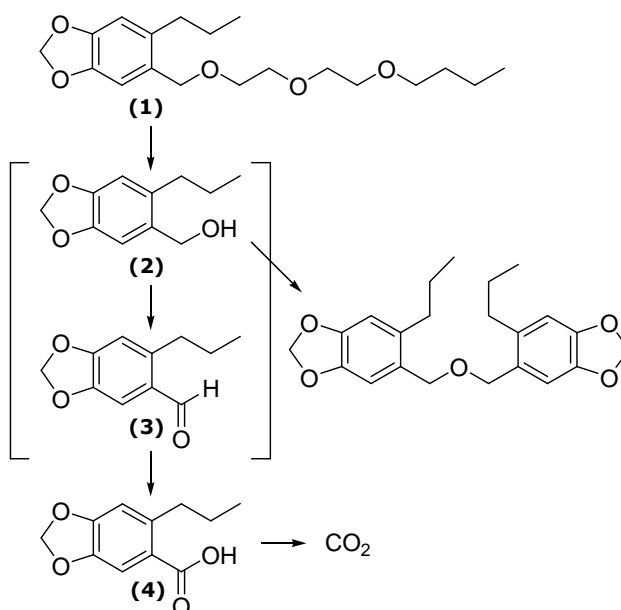


Figura I.5.24 Fotoproductos del PBO (1) identificados por [74-76].

Finalmente, Draper estudió la fotoquímica de la rotenona (pesticida) y del PBO bajo condiciones que simulan los **sistemas acuáticos naturales** mediante ionización por electrospray-cromatografía líquida-espectrometría de masas (**ESI-LC-MS**). Las muestras de agua se irradiaron en un fotorreactor provisto de una **lámpara UV** (310-410 nm, $\lambda_{\text{máx}}$ 350 nm). Se observó que el PBO se fotodescomponía con una vida media de 220 min y con una constante de velocidad de primer orden de 0,0032 min⁻¹. [77]

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Verhoeven, J.W. Glosary of terms used in photochemistry. *Pure & Appl. Chem.* **1996**, 68, 2223-2286.
- [2] Stangroom, S.J.; Collins, C.D.; Lester, J.N. Abiotic behaviour of organic micropollutants in soils and the aquatic environment. A review: II. Transformations. *Environ. Technol.* **2000**, 21, 865-882.
- [3] Gavrilescu, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.* **2005**, 5, 497-526.
- [4] Andreu, V.; Picó, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 772-789.
- [5] Dabrowska, D.; Kot-Wasik, A.; Namieśnik, J. Pathways and analytical tools in degradation studies of organic pollutants. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2005**, 35, 155-176.
- [6] Pera-Titus, M.; García-Molina, V.; Baños, M.A.; Giménez, J.; Esplugas, S. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Appl. Catal. B-Environ.* **2004**, 47, 219-256.
- [7] Legrini, O.; Oliveros, E.; Braun, A.M. Photochemical processes for water treatment. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 671-698.
- [8] Shemer, H.; Sharpless, C.M.; Linden, K.G. Photodegradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in aqueous solution. *Water Air Soil Poll.* **2005**, 168, 145-155.
- [9] Czaplicka, M.; Manko, T.; Wypych, J. Determination of chlorophenols and their photodegradation products in aqueous solutions using liquid-liquid extraction and solid phase microextraction: a comparison. *Chem. Anal-Warsaw* **2005**, 50, 887-896.
- [10] Pignatello, J.J. Dark and photoassisted iron(3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26, 944.
- [11] Sakkas, V.A.; Konstantinou, I.K.; Albanis, T.A. Aquatic phototransformation study of the antifouling agent sea-Nine 211: identification of byproducts and the reaction pathway by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2002**, 959, 215-227.

- [12] Peñuela, G.A.; Barceló, D. Comparative degradation kinetics of alachlor in water by photocatalysis with $\text{FeCl}_3/\text{TiO}_2$ and photolysis, studied by solid-phase disk extraction followed by gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* **1996**, 754, 187-195.
- [13] Gonçalves, C.; Dimou, A.; Sakkas, V.; Alpendurada, M.F.; Albanis, T.A. Photolytic degradation of quinalphos in natural Waters and on soil matrices under simulated solar irradiation. *Chemosphere* **2006**, 64, 1375-1382.
- [14] Sakellarides, T.M.; Sakkas, V.A.; Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. Application of solid-phase microextraction (SPME) for photocatalytic studies of fenitrothion and methyl parathion in aqueous TiO_2 suspensions. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, 84, 161-172.
- [15] Hebert, V.R.; Hoonhout, C.; Miller, G.C. Use of stable tracer studies to evaluate pesticide photolysis at elevated temperatures. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1916-1921.
- [16] D'Auria, M.; Racioppi, R.; Velluzzi, V. Photodegradation of crude oil: liquid injection and headspace solid-phase microextraction for crude oil analysis by gas chromatography with mass spectrometer detector. *J. Chromatogr. Sci.* **2008**, 46, 339-344.
- [17] Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Green analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, 497-511.
- [18] Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Fernández-Álvarez, M.; García-Jares, C.; Lores, M. A novel use of sorbents for photochemical studies: photo-solid-phase microextraction (photo-SPME). En *Sorbents: Properties, Materials and Applications*, Willis, T.P. Ed.; NOVA Publishers, **2009**.
- [19] Lores, M.; Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Solid-phase microextraction as a powerful tool in photochemical studies. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, 85, 281-291.
- [20] Lores, M.; Llompart, M.; González-García, R.; González-Barreiro, C.; Cela, R. On-fibre photodegradation studies of polychlorinated biphenyls using SPME-GC-MS-MS: a new approach. *Chemosphere*, **2002**, 47, 607-615.
- [21] Lores, M.; Llompart, M.; González-García, R.; González-Barreiro, C.; Cela, R. Photolysis of polychlorinated biphenyls by solid-phase microextraction: "On-fibre" versus aqueous photodegradation. *J. Chromatogr. A* **2002**, 963, 37-47.

- [22] Llompart, M.; Lores, M.; Lourido, M.; Sánchez-Prado, L.; Cela, R. On-fiber photodegradation after solid-phase microextraction of *p,p'*-DDT and two of its major photoproducts, *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD. *J. Chromatogr. A* **2003**, 985, 175-183.
- [23] Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Lores, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Application of solid-phase microextraction to the study of the photochemical behaviour of five priority pesticides : "on-fiber" and aqueous photodegradation. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1047, 271-279.
- [24] Sánchez-Prado, L.; González-Barreiro, C.; Lores, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Photochemical studies of a polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) technical mixture by solid phase microextraction (SPME). *Chemosphere*, **2005**, 60, 922-928.
- [25] Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Lores, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Investigation of photodegradation products generated after UV-irradiation of five polybrominated diphenylethers using photo solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1071, 85-92.
- [26] Sánchez-Prado, L.; Lores, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Bayona, J.M.; Cela, R. Natural sunlight and sun simulator photolysis studies of tetra- to hexa-brominated diphenyl ethers in water using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1124, 157-166.
- [27] Sánchez-Prado, L.; Lores, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Lourido, M.; Cela, R. Further solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry applications: "on-fibre" and aqueous photodegradation of nitro musks. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1048, 73-80.
- [28] Sánchez-Prado, L.; Lourido, M.; Lores, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Study of the photoinduced degradation of polycyclic musk compounds by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 1186-1192.
- [29] Lores, M.; Llompart, M.; Sánchez-Prado, L.; García-Jares, C.; Cela, R. Confirmation of the formation of dichlorodibenzo-p-dioxin in the photodegradation of triclosan by photo-SPME. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 1294-1298.

- [30] Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Lores, M.; Fernández-Álvarez, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Further research on the photo-SPME of triclosan. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 1548-1557.
- [31] Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Lores, M.; García-Jares, C.; Bayona, J.M.; Cela, R. Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. *Chemosphere* **2006**, 65, 1338-1347.
- [32] Mueller-Beilschmidt, D. The toxicology and environmental fate of synthetic pyrethroids. *J. Pestic. Reform.* **1990**, 10, 32-38.
- [33] Ruza, L.O.; Casida, J.E. Metabolism and toxicology of pyrethroids with dihalovinyl substituents. *Environ. Health Perspect.* **1977**, 21, 285-292.
- [34] Holmstead, R.L.; Fullmer, D.G. Photodecarboxylation of cyanohydrin esters. Models for pyrethroid photodecomposition. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 56-58.
- [35] Ruza, L.O.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: mechanistic aspects in reactions of dihalovinylcyclopropanecarboxylate substituents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 3, 728-732.
- [36] Ruza, L.O.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: Intramolecular sensitization and photoreactivity of 3-phenoxybenzyl, 3-phenylbenzyl, and 3-benzoylbenzyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 963-966.
- [37] Chen, Y.-L.; Casida, J.E. Photodecomposition of pyrethrin I, allethrin, phthalthrin, and dimethrin. Modifications in the acid moiety. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17, 208-215.
- [38] Ruza, L.O.; Gaughan, C.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: S-Bioallethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 246-249.
- [39] Kawano, Y.; Yanagihara, K.; Miyamoto, T.; Yamamoto, I. Examination of the conversion products of pyrethrins and allethrin formulations exposed to sunlight by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1980**, 198, 317-328.
- [40] Kimmel, E.C.; Casida, J.E.; Ruza, L.O. Identification of mutagenic photoproducts of the pyrethroids allethrin and terallethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 623-626.
- [41] Isobe, N.; Matsuo, M.; Miyamoto, J. Novel photoproducts of allethrin. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 861-864.

- [42] Casjens, H. *Environmental Fate of Cyfluthrin*, <www.cdpr.ca.gov/docs/empm/pubs/fatememo/cyflthrn.pdf> (Consulta: 10-06-09).
- [43] U.S. Environmental Protection Agency. *Environmental Fate Assessment for the Synthetic Pyrethroids*. <<http://www.epa.gov/scipoly/SAP/meetings/1999/february/pyreth.pdf>> (Consulta: 10-06-09)
- [44] Hall, J.S.; Leahey, J.P. *Cyhalothrin: Fate in river water*. **1983** (Unpublished proprietary report No. RJ0320B, submitted to WHO by ICI).
- [45] Curl, E.A.; Leahey, J.P.; Lloyd, S.J. *PP321: Aqueous photolysis at pH 5*. **1984** (Unpublished proprietary report No. RJ0362B, submitted to WHO by ICI).
- [46] Curl, E.A.; Leahey, J.P.; Lloyd, D. *PP321: Photodegradation on a soil surface*. **1984** (Unpublished proprietary report No. RJ0358B, submitted to WHO by ICI).
- [47] Ruzo, L.O.; Krishnamurthy, V.V.; Casida, J.E.; Gohre, K. *Pyrethroid photochemistry: Influence of the chloro(trifluoromethyl)vinyl substituent in cyhalothrin*. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 879-883.
- [48] Day, S.R.; Leahey, J.P. *¹⁴C-cypermethrin: aqueous photodegradation in sunlight*. *Fernhurst, Imperial Chemical Industries* **1980** (Unpublished ICI Report No. RJ0154B).
- [49] Hall, J.S.; Leahey, J.P.; Curl, E.A. *Cypermethrin: photodegradation on a soil surface*. *Fernhurst, Imperial Chemical Industries* **1981** (Unpublished ICI Report No. RJ0192B).
- [50] Ruzo, L.O. *Involvement of oxygen in the photoreactions of cypermethrin and other halogenated pyrethroids*. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 1113-1115.
- [51] Takahashi, N.; Mikami, N.; Matsuda, T.; Miyamoto, J. *Hydrolysis of the pyrethroid insecticide cypermethrin in aqueous media*. *J. Pestic. Sci.* **1985**, 10, 643-648.
- [52] Takahashi, N.; Mikami, N.; Matsuda, T.; Miyamoto, J. *Photodegradation of the pyrethroid insecticide cypermethrin in water and on soil surface*. *J. Pestic. Sci.* **1985**, 10, 629-642.
- [53] Raikwar, M.K.; Nag, S.K. *Phototransformation of α -cypermethrin as thin film on glass and soil surface*. *J. Environ. Sci. Health., Part B* **2006**, 41, 973-988.
- [54] Segal-Rosenheimer, M.; Dubowski, Y. *Photolysis of thin films of cypermethrin using in situ FTIR monitoring: Products, rates and quantum yields*. *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, 200, 262-269.

- [55] Ruza, L.O.; Holmstead, R.L.; Casida, J.E. Solution photochemistry of the potent pyrethroid insecticide α -cyano-3-phenoxybenzyl-*cis*-2,2-dimethyl-3-(2,2-dibromovinyl)cyclopropanecarboxylate. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 35, 3045-3048.
- [56] Ruza, L.O.; Holmstead, R.L.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: Decamethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 1385-1394.
- [57] Bowman, H.; Carpenter, M. Determination of photodegradation of ^{14}C -deltamethrin in aqueous solution. **1987** (*Unpublished proprietary report ABC LABS 35491, submitted to WHO by Roussel Uclaf*).
- [58] Maguire, R.J. Chemical and photochemical isomerisation of deltamethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1613-1617.
- [59] Holmstead, R.L.; Fullmer, D.G.; Ruza, L.O. Pyrethroid photodecomposition: Pydrin. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 954-959.
- [60] Takahashi, N.; Mikami, N.; Matsuda, T.; Miyamoto, J. Photodegradation of the [2*S*, α *S*] isomer of fenvalerate in distilled water. **1985** (*Unpublished report No. LLM-50-0001 submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd*).
- [61] Katagi, T.; Mikami, N.; Matsuda, T.; Miyamoto, J. Photodegradation of fenvalerate and esfenvalerate on soil. **1985** (*Unpublished report No. LLM-50-0005 submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd*).
- [62] Mikami, N.; Takahashi, N.; Hayashi, K.; Miyamoto, J. Photodegradation of fenvalerate (Sumicidin). *J. Pest. Science* **1980**, 5, 225-236.
- [63] Katagi, T. Photodegradation of the pyrethroid insecticide esfenvalerate on soil, clay minerals, and humic acid surfaces. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1351-1356.
- [64] Katagi, T. Photodegradation of esfenvalerate in clay suspensions. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 2178-2183.
- [65] Sanjuan, A.; Aguirre, G.; Alvaro, M.; Garcia, H.; Scaiano, J.C.; Chretien, M.N.; Focsaneanu, K.S. Product studies and laser flash photolysis of direct and 2,4,6-triphenylpyrylium-zeolite Y photocatalyzed degradation of fenvalerate. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 955-959.
- [66] Suzuki, Y.; Katagi, T. Novel fluorescence detection of free radicals generated in photolysis of fenvalerate. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 10811-10816.
- [67] Chattopadhyaya, S.; Dureja, P. Photolysis of flucythrinate. *Pestic. Sci.* **1991**, 31, 163-173.

- [68] Dureja, P.; Chattopadhyaya, S.; Photodegradation of pyrethroid insecticide flucythrinate in water and on soil surface. *Toxicol. Environ. Chem.* **1995**, 52, 97-102.
- [69] Holmstead, R.L.; Casida, J.E.; Ruzo, L.O.; Fullmer, D.G. Pyrethroid photodecomposition: Permethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 590-595.
- [70] Rawn, G.P.; Webster, G.R.B.; Muir, D.C.G. Fate of permethrin in model outdoor ponds. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **1982**, 17, 463-486.
- [71] Ruzo, L.O.; Smith, I.H.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: photooxidation reactions of the chrysanthemates phenothrin and tetramethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 110-115.
- [72] Evaluation on: transfluthrin use as a public hygiene insecticide, Advisory Committee on Pesticides, York, UK, **1997**.
- [73] Fishbein, L.; Gaibel, Z.L.F. Photolysis of pesticidal synergists. I. Piperonyl butoxide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1971**, 5, 546-552.
- [74] Piperonyl butoxide photodegradation on soil. *Huntingdon Research Centre Lit. Study No. PBT 6* **1995**, Unpublished.
- [75] Selim, S. Isolation and identification of major degradates of piperonyl butoxide (PBO) following aqueous photolysis. *Biological Test Center Study No. P059410* **1995**, Unpublished.
- [76] Harbach, C.A.J. GC/EIMS analysis of PBO exposed to UV light in the presence and absence of moisture (Certificate of Analysis). *M-Scan Ltd. Study No. 9506/7804* **1995**, Unpublished.
- [77] Draper, W.M. Near UV quantum yields for rotenone and piperonyl butoxide. *Analyst* **2002**, 127, 1370-1374.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En España, la **agricultura** y la **ganadería** siguen representando, junto con la industria de transformación y comercialización de productos agrícolas, algunos de los sectores económicos y sociales más importantes, debido, por una parte, a su papel como suministrador de alimentos a la sociedad y de materias primas a la industria agroalimentaria y, por otra, por constituir la principal actividad económica y fuente de empleo del medio rural, evitando así el abandono de estas zonas. La **relación entre agricultura, ganadería y medioambiente** puede analizarse en torno a tres ejes: destrucción o alteración de los recursos naturales (uso inadecuado del agua y del suelo, destrucción de la cobertura seminatural del suelo, destrucción de la biodiversidad relacionada), conservación y mejora del medioambiente (creación o conservación de paisajes y de hábitats, conservación de diversidad genética, producción de fuentes de energía renovables) y **contaminación** (debida a nitratos y otros nutrientes, **residuos de pesticidas**, salinización, emisiones, deposiciones de amoníaco y metano). [1]

Existen evidencias de que un número cada día mayor de pesticidas comunes pueden ser dañinos, tanto para las personas, como para otros seres vivos y el medioambiente en general. Parte del problema reside en la **toxicidad** de estos compuestos, pero un factor todavía más importante es la **gran cantidad de pesticidas** que se utilizan actualmente así como **el comportamiento y la persistencia en el medioambiente** de determinados fitosanitarios (algunos de ellos prohibidos desde hace décadas).

Uno de los medios receptores de la contaminación por pesticidas más vulnerables es el **suelo**, desde donde estos compuestos pueden llegar a la atmósfera, a aguas superficiales o subterráneas, o a las plantas. De esta manera, **plantas agrícolas empleadas para la alimentación del ganado** pueden contener pesticidas; consecuentemente, a través de la ingestión de pastos, forrajes ensilados o piensos (elaborados a partir de materias primas vegetales) contaminados, es posible que animales productores de **leche**, como las vacas, acumulen residuos de plaguicidas.

Por estos motivos y, teniendo en cuenta que la leche es uno de los productos de mayor consumo humano, uno de los **objetivos** de este trabajo es conocer el impacto global del uso de productos fitosanitarios propios de las prácticas agrícolas en las **explotaciones de ganado vacuno en Galicia**, así como su repercusión en la calidad

final de la leche. En esta línea, resulta de gran interés el análisis de matrices relacionadas con la **alimentación del ganado** (p.ej. piensos) con el objetivo de poder monitorizar la trayectoria de los pesticidas a lo largo de la cadena de producción primaria, hasta llegar al producto final, **la leche**. Además, también se ha pretendido evaluar el impacto medioambiental derivado del uso de pesticidas en la agricultura mediante el análisis de **suelos agrícolas**.

Hay que tener en cuenta que es fundamental el poder detectar los residuos de fitosanitarios a niveles por debajo de los **límites legales** establecidos por la legislación española y europea (niveles de referencia genéricos en suelos y MRLs en productos de origen vegetal y animal) [2-5].

Así, una de las pretensiones de este trabajo ha sido el desarrollo de metodologías **sensibles y selectivas** para la **determinación de pesticidas** en muestras ambientales y agroalimentarias como son **suelo, pienso y leche de vaca**. En particular se han estudiado más de 30 fitosanitarios orgánicos, todos ellos analizables mediante **cromatografía de gases**, como son:

- **pesticidas organoclorados:** concretamente se han estudiado 20 de estos compuestos (incluyendo algún producto de su degradación), la mayoría de ellos fuera del mercado desde hace años, pero todavía presentes en el medioambiente debido a su gran persistencia y a su potencial de bioacumulación;
- **pesticidas piretroides:** se han investigado un total de 12 insecticidas, muchos de ellos de uso cada vez más frecuente (p.ej. cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, cihalotrina);
- **pesticidas organofosforados** (clorpirifos y fenitrotion) y **cloroacetanilidas** (alacloro y acetocloro): componentes activos de los insecticidas y herbicidas más habituales empleados en el cultivo del maíz en Galicia.

Es importante destacar que, para alcanzar los objetivos marcados, los esfuerzos se han centrado fundamentalmente en la **preparación de muestra**, imprescindible antes del análisis cromatográfico y que constituye la etapa más importante y compleja del

proceso analítico, especialmente cuando se trata de analizar **matrices complicadas** como las manejadas en este trabajo (suelo, pienso y leche). En todo momento se ha procurado simplificar al máximo esta etapa mediante el uso de **técnicas de extracción modernas (SPME, MSPD y PSE)** cumpliendo así con algunos de los principios más importantes de la **química verde** [6] como es el bajo consumo de disolventes orgánicos, y consiguiendo a la vez una disminución considerable en los tiempos de procesamiento de muestra.

Por otro lado, la **degradación de los pesticidas por acción de la luz** es uno de los procesos más importantes que determinan el destino y persistencia de estos compuestos en los diferentes compartimentos medioambientales. En particular, se ha considerado interesante el estudio de la fotodegradación de los insecticidas **piretroides** debido al uso *in crescendo* de estos fitosanitarios en el control de plagas, tanto en el ámbito doméstico como en el agrícola. Previamente, otros autores han publicado estudios en los que se ha investigado la degradación fotoquímica de varios piretroides; no obstante, muchos de estos trabajos se caracterizan por el tedio de los procedimientos analíticos empleados, así como por el uso de técnicas cromatográficas poco evolucionadas como es la cromatografía en capa fina. Además, cabe destacar la escasez o ausencia de información acerca del comportamiento fotoquímico de algunos de estos insecticidas (p.ej. ciflutrina, transflutrina, empenetrina y cifenotrina).

Así, otro de los objetivos de esta Tesis ha sido el **estudio de la fotodegradación** de doce piretroides y de un sinergista habitual en sus formulaciones (butóxido de piperonilo). Para ello se ha recurrido a la **foto-SPME** [7], herramienta analítica desarrollada por nuestro grupo de investigación y que ha demostrado su extraordinario potencial en estudios fotoquímicos sobre la degradación de compuestos orgánicos persistentes y emergentes. Mediante esta técnica, y utilizando el acoplamiento GC-MS como técnica de separación y detección, se ha obtenido información cuantiosa acerca de las cinéticas de fotodegradación de los compuestos investigados, así como de los fotoproductos generados; todo ello mediante experimentos rápidos, sencillos y *verdes*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Perfil Ambiental de España 2007. Informe basado en indicadores. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España.
- [2] Regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- [3] Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed, *Off. J. Eur. Comm.*, N° L140/10, 30 May 2002.
- [4] Commission Regulation (EC) N° 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV setting maximum residue levels of pesticides in or on certain products.
- [5] Ministerio de la Presidencia de España (2005) Real Decreto 9/2005, Boletín Oficial del Estado 15/2005, 1833-1843.
- [6] Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Green analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* **2008**, 27,497-511.
- [7] Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Fernández-Álvarez, M.; García-Jares, C.; Lores, M. A novel use of sorbents for photochemical studies: photo-solid-phase microextraction (photo-SPME). En *Sorbents: Properties, Materials and Applications*, Willis, T.P. Ed.; NOVA Publishers, **2009**.

III. EXPERIMENTAL

En este capítulo se incluyen los medios experimentales empleados para la realización de los distintos trabajos de investigación, especificando los patrones empleados, los reactivos generales y el material utilizado, además de los protocolos de limpieza y acondicionamiento de ciertos materiales y reactivos.

Más adelante, en los correspondientes apartados del Capítulo IV, dedicado a la discusión de resultados, se especifican para cada caso en particular las muestras analizadas incluyendo su pretratamiento, el modo en que se han realizado las adiciones de los analitos sobre ellas, la técnica de extracción y las condiciones de medida utilizadas.

1. PATRONES

Los nombres de los compuestos estudiados en este trabajo se citan en la Tabla III.1, en la que también se especifica qué analitos fueron incluidos en cada uno de los trabajos de investigación de esta Tesis. Estos compuestos se han obtenido de diferentes casas comerciales (Riedel-de-Häen, Supelco, Dr. Ehrenstorfer). Los pesticidas organoclorados se han adquirido en forma de una mezcla de todos ellos al nivel de $2000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ en tolueno:hexano (50:50), mientras que para los restantes compuestos se dispuso de patrones individuales sólidos con distinta pureza. No obstante, también se adquirieron algunos patrones individuales de organoclorados con el objetivo de asignar los tiempos de retención de cada uno de ellos durante la optimización de las separaciones cromatográficas.

PCB-166 y PCB-195 se emplearon como estándar interno y surrogado, respectivamente, en aquellos estudios en los que fue necesario (Determinación de pesticidas en piensos, Capítulo IV.2). Ambos se obtuvieron como disoluciones de $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ en isooctano (Dr. Ehrenstorfer).

Tabla III.1 Patrones utilizados en esta Tesis. Las celdas sombreadas indican en qué estudio(s) se han incluido cada uno de los compuestos.

Patrón	Capítulo			
	IV.1 ^a	IV.2 ^b	IV.3 ^c	IV.4 ^d
Aletrina , mezcla de estereoisómeros				
Cifenotrina , mezcla de isómeros <i>cis</i> y <i>trans</i>				
Ciflutrina , mezcla de isómeros				
λ-Cihalotrina				
Cipermetrina , mezcla de isómeros				
Deltametrina				
Empentrina				
Fenotrina , mezcla de isómeros				
Fenvalerato				
Flucitrinato				
Permetrina , mezcla de isómeros <i>cis</i> y <i>trans</i>				
Teflutrina , mezcla de isómeros				
Tetrametrina				
Transflutrina				
Butóxido de piperonilo				
Clorpirifos				
Fenitrothion				
Acetocloro				
Alacloro				
Aldehído de endrina				
Aldrina				
Cetona de endrina				
α-Clordano				
γ-Clordano				
4,4'-DDD				
4,4'-DDE				
4,4'-DDT				
Dieldrina				
Endosulfán I				
Endosulfán II				
Endrina				
Epóxido de heptacloro				
Heptacloro				
α-Lindano				
β-Lindano				
γ-Lindano				
δ-Lindano				
Metoxicloro				
Sulfato de endosulfán				

^aDeterminación de pesticidas en suelo

^bDeterminación de pesticidas en pienso

^cDeterminación de pesticidas en leche

^dFotodegradación de pesticidas

2. REACTIVOS, GASES Y DISOLVENTES

▪ DISOLVENTES:

- Agua ultrapura (Milli-Q), obtenida en el propio laboratorio con un sistema de purificación (Millipore).
- Acetato de etilo, grado HPLC (Merck, Prolabo).
- n-Hexano, grado GC (Merck).
- Metanol, grado gradiente (Merck).
- Isooctano, para análisis de trazas orgánicas y grado GC (Merck).
- Tolueno, grado HPLC (Merck).
- Acetona, grado GC (Merck) y grado pesticida (Prolabo).
- Acetona y metanol de baja calidad para la limpieza del material (Prolabo).

▪ GASES:

- Helio, 99,999% (Carbueros Metálicos), usado como gas portador de los GC-MS y GC- μ ECD.
- Nitrógeno C-55 (Carbueros Metálicos) usado como gas auxiliar del GC- μ ECD y en el miniconcentrador por corriente de nitrógeno.

▪ REACTIVOS:

- Sulfato sódico anhidro, 99% (Panreac).
- Cloruro Sódico, 99,0-100,5% (Merck).
- Cobre (Sigma-Aldrich).
- Ácido clorhídrico, 37% (Merck).

▪ ADSORBENTES:

- Florisil, 60-100 mesh (Aldrich).
- Alúmina neutra, 150 mesh (Aldrich).
- C₁₈, 70-230 (Aldrich).
- Sílica, 230-400 mesh (Merck).
- Supelclean PSA (amina primaria y secundaria) SPE, 38-35 μ m (Supelco).
- Carbón no-poroso grafitizado, 100-400 mesh (Supelco).

▪ **VARIOS:**

- Arena, 50-70 mesh (Sigma-Aldrich).
- Jabón libre de fosfatos.

3. MATERIAL

▪ **AGITACIÓN:**

- Agitador magnético con placa calefactora (P-Selecta, modelo Agimatic-N).
- Para la agitación de las muestras no se emplearon las habituales barritas agitadoras recubiertas de politetrafluoroetileno (PTFE), dado que se observó que los piretroides se adsorbían fuertemente a ellas. La descontaminación de las barritas no se logró incluso después sonicar las mismas con disolvente orgánico varias veces. Por eso, en lugar de las barritas, se decidió utilizar clavos de acero bicromatado de 14 mm de longitud.
- Vórtex (Velp Científica; Heidolph REAX top).

▪ **BALANZAS:**

- Balanza analítica, con 5 cifras decimales (Sartorius BP211D).
- Granatario, con 3 cifras decimales (Sartorius BP310S y Sartorius ED323S).

▪ **MATERIAL DE LABORATORIO:**

- Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio.
- Espátulas metálicas.
- Jeringas de polietileno (2 y 10 mL).
- Cartuchos de MSPD con frita (ISOLUTE).
- Fritas para cartuchos de MSPD (ISOLUTE).
- Filtros de jeringa de difluoruro de polivinilideno (PVDF), 0,22 μm , 33 mm (Millipore).
- Cartuchos de SPE: Alumina N, Florisil, Silica y C₁₈ Sep-Pak (Waters).
- Mortero y pistilo de vidrio.
- Papel de aluminio.
- Papel indicador, pH 1-14 (Panreac).

- Termómetro de mercurio, con escala de 0 a 150 °C.
 - Soportes, pinzas y nueces.
 - Cronómetro.
 - Gafas de protección para la luz UV.
- **MICROJERINGAS Y MICROPIPETAS:**
- Jeringas de inyección manual para cromatografía de gases de 10 µL de volumen (Hamilton).
 - Microjeringas para adición de distintos volúmenes entre 1 y 1000 µL (Hamilton).
 - Pipetas automáticas fijas y variables de diferentes volúmenes (Eppendorf, Transferpette, Fixopet Kartell).
- **REFRIGERACIÓN Y SECADO:**
- Nevera a una temperatura de +4 °C o inferior.
 - Congelador a una temperatura de -20 °C o inferior.
 - Desecador.
 - Estufa.
- **SISTEMAS DE EXTRACCIÓN:**
- Soporte de fibras SPME para uso manual (Supelco).
 - Fibras de SPME: PDMS (100 µm), PDMS-DVB (65 µm), PA (85 µm), CAR-PDMS (75 µm), CW-DVB (65 µm) (Supelco).
 - Sistema de extracción con disolventes presurizados ASE 200 (Dionex).
 - Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- **EQUIPO DE CONCENTRACIÓN:** Miniconcentrador por corriente de nitrógeno (Mini-Vap, Supelco).
- **VIALES:**
- Viales de gases (1,7 mL) con sus correspondientes cápsulas de aluminio y septa recubiertos de PTFE/silicona.
 - Viales ámbar de rosca (4, 8 y 16 mL) con sus correspondientes tapones y septa recubiertos de PTFE/silicona.

- Viales de espacio de cabeza (10, 22, 120 mL) con sus correspondientes cápsulas de aluminio y septa recubiertos de PTFE/silicona.
- Encapsuladores y desencapsuladores, grandes y pequeños.

4. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO

4.1 CAPÍTULOS IV.1, IV.2 Y IV.3 (DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN SUELO, PIENSO Y LECHE)

Se prepararon, a partir de los patrones comerciales y por pesada, disoluciones stock de 1.000-10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de los pesticidas piretroides, cloroacetanilidas y organofosforados en acetona, metanol, isooctano o acetato de etilo, dependiendo del compuesto. A continuación, se prepararon disoluciones intermedias de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en acetona a partir de las disoluciones stock y de la disolución comercial de pesticidas organoclorados. Finalmente, por dilución de las disoluciones intermedias, se prepararon disoluciones de trabajo conteniendo todos los pesticidas en acetato de etilo (para el chequeo diario de los equipos cromatográficos) o en acetona (para realizar las adiciones sobre las muestras de suelo, leche o pienso a analizar).

Para la localización de los tiempos de retención también se prepararon disoluciones individuales de algunos de los pesticidas estudiados de 100-1000 ng mL^{-1} en acetato de etilo.

En los casos necesarios (Capítulo IV.2) también se preparó una disolución de PCB-195 (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en isooctano a partir de la disolución comercial.

4.2 CAPÍTULO IV.4 (FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES)

Se prepararon, por pesada, disoluciones stock individuales (900-12.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en acetona de cada uno de los compuestos estudiados a partir de los correspondientes patrones comerciales. Por dilución de las disoluciones stock se obtuvieron disoluciones en acetona conteniendo uno o varios analitos a un nivel de concentración comprendido entre 5 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir de estas disoluciones en acetona se prepararon las

muestras de agua empleadas tanto en los experimentos de foto-SPME como en las medidas espectrométricas. También se prepararon disoluciones en hexano o en acetato de etilo de 100-1000 ng mL⁻¹ para la evaluación de los equipos instrumentales.

Las disoluciones, una vez preparadas, se agitaron unos minutos en el vórtex, dejándolas equilibrar durante al menos una hora a temperatura ambiente antes de su utilización. Todas las disoluciones se conservaron en viales de ámbar a -20 °C.

5. ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DEL MATERIAL

A continuación se exponen las condiciones adoptadas para la limpieza del material, así como el proceso de acondicionamiento de las fibras de SPME empleadas. Puesto que se trabaja en el análisis de trazas, es necesario extremar las medidas de limpieza procurando minimizar las interferencias o la contaminación en los experimentos realizados. También se ha incluido un apartado en el que se explica el acondicionamiento de los reactivos utilizados en algunos análisis.

5.1 LIMPIEZA DEL MATERIAL

El protocolo seguido para la limpieza del material de vidrio y de las celdas de PSE consistió en sucesivos lavados con agua de grifo y con jabón libre de fosfatos. A continuación, el material se enjuagó varias veces con agua de grifo, agua Milli-Q, acetona y metanol. Además, las fritas y las arandelas de las celdas se sonicaron tres veces (15 min) con una mezcla de tres disolventes (metanol:acetona:hexano, 1:1:1, v/v). Finalmente, todo el material (excepto el material de vidrio volumétrico y las arandelas de PTFE de las celdas de PSE) se secó en estufa.

Como medida de precaución, ningún vial utilizado en las extracciones por SPME que estuviese en contacto con los analitos fue reutilizado.

Los clavos empleados para la agitación de las muestras en SPME no se reutilizaron, sino que se desecharon como residuos sólidos una vez realizado el análisis. Sin

embargo, requirieron una limpieza previa a su utilización consistente en tres lavados sucesivos en baño de ultrasonidos durante 15 min con la mezcla de disolventes metanol:acetona:hexano (1:1:1, v/v).

5.2 ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DE FIBRAS DE SPME

Antes de utilizarlos por primera vez, resulta necesario acondicionar los recubrimientos de fibra de SPME con el fin de evitar la aparición de picos cromatográficos no deseados. Este acondicionamiento se llevó a cabo exponiendo la fibra a elevada temperatura bajo corriente de nitrógeno en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (distinto al utilizado para los análisis), siguiendo las condiciones de temperatura y tiempo recomendadas por el fabricante para cada recubrimiento de fibra, tal y como se recoge en la Tabla III.2.

Tabla III.2 Condiciones recomendadas para el acondicionamiento de las fibras de SPME empleadas.

Fibra	Acondicionamiento	
	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
PDMS 100 µm	250	1
PDMS-DVB 65 µm	260	0,5
CAR-PDMS 75 µm	280	0,5
CW-DVB 65 µm	250	0,5
PA 85 µm	300	2

Todos los días, antes de comenzar a realizar los análisis, el recubrimiento de fibra a utilizar se desorbió en el inyector de un cromatógrafo de gases durante 5 min a la temperatura de trabajo. Del mismo modo, para evitar posible memoria entre prueba y prueba, las fibras se desorbieron entre análisis consecutivos.

5.3 ACONDICIONAMIENTO DE REACTIVOS

Antes de utilizar Florisil, alúmina y sílica, se deben acondicionar, eliminando la humedad que puedan contener. Para ello, se mantuvieron en estufa a 130 °C durante 12 h, permaneciendo después en un desecador hasta el momento de su utilización.

Por otro lado, el carbón no poroso grafitizado se lavó con acetona, hexano y acetato de etilo, se secó a vacío y, finalmente, se mantuvo en un desecador hasta el momento de su uso.

Para la activación del cobre, se lavó tres veces con ácido clorhídrico al 20% durante 15 min en el baño de ultrasonidos; a continuación, se lavó con agua Milli-Q hasta alcanzar pH 7 y, finalmente, se lavó tres veces con acetona y hexano y se almacenó en el congelador en este último disolvente.

6. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los residuos generados durante el proceso experimental se clasificaron en sólidos y líquidos. Los residuos sólidos que incluyen además del material de plástico desechable, los viales conteniendo muestras sólidas y los clavos empleados como agitadores, se almacenaron en contenedores de residuos sólidos de 100 L. Los residuos líquidos, por su parte, se separaron en acuosos y orgánicos, almacenándose por separado en bidones de 25 L. Además, los residuos de disolventes orgánicos que no contuviesen ninguno de los analitos investigados se separaron en clorados y no clorados. Todos los contenedores de residuos debidamente etiquetados fueron recogidos y gestionados por la Unidad de Gestión de Residuos de la Universidad de Santiago de Compostela.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este **Capítulo IV** de Resultados y Discusión hay dos partes claramente diferenciadas. Por un lado, el desarrollo de **procedimientos de preparación de muestra** para la determinación de fitosanitarios en muestras ambientales y agroalimentarias (Capítulos IV.1, IV.2 y IV.3) y, por otro, el estudio de la **fotodegradación** de insecticidas piretroides (Capítulo IV.4).

En los **Capítulos IV.1 y IV.3** se discute la aplicación de la microextracción en fase sólida (SPME) al análisis de los pesticidas objetivo tanto en muestras de **suelo** como de **leche de vaca**. El **Capítulo IV.2**, por su parte, está centrado en la determinación de dichos compuestos en **pienso de ganado**, recurriendo para ello a la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) o a la extracción con fluidos presurizados (PSE). En cuanto a las técnicas de separación y análisis utilizadas, se ha recurrido a la cromatografía de gases (GC) con detector de microcaptura electrónica (μ ECD) o de espectrometría de masas (MS). Para la optimización de las variables que pudieran afectar a los procesos de extracción se han empleado herramientas quimiométricas. Además, se han determinado los parámetros analíticos de calidad de los métodos propuestos y, en último lugar, se ha evaluado la aplicabilidad de los mismos mediante el análisis de muestras reales.

Finalmente, en el **Capítulo IV.4** se comentan los resultados obtenidos en la investigación del **comportamiento fotoquímico** de varios piretroides y del butóxido de piperonilo mediante foto-SPME-GC-MS. Estos estudios han consistido en la obtención de curvas cinéticas de fotodegradación de los distintos analitos, y en el establecimiento de los mecanismos de degradación de los mismos sobre la base de los fotoproductos generados e identificados tentativamente. Además, también se han trazado las curvas cinéticas de estos productos de fotodegradación y se ha realizado una búsqueda bibliográfica relacionada con la posible toxicidad de los mismos.

CAPÍTULO IV.1. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN SUELO

El **suelo** constituye uno de los medios receptores de la **contaminación por pesticidas** más sensibles y vulnerables. De hecho, muchos fitosanitarios, incluso algunos prohibidos desde hace años, han sido detectados en suelo recientemente [1-4]. La importancia de la determinación de pesticidas en esta matriz reside en el hecho de que, desde el suelo, estos compuestos pueden llegar a otros compartimentos medioambientales como son la atmósfera o las aguas subterráneas y superficiales. Por otro lado, los pesticidas también pueden ser absorbidos por las plantas.

En los últimos años, las **metodologías clásicas** utilizadas para la determinación de fitosanitarios en matrices sólidas (p.ej. aquellas basadas en extracciones Soxhlet) han sido reemplazadas por **técnicas más modernas** y rápidas, y que implican un menor consumo de disolventes orgánicos como MAE [5, 6], extracción con fluidos supercríticos (SFE) [3, 7], PSE [8, 9], o extracción por ultrasonidos (USE) [10-12]. Además, tal y como se ha detallado en el **Apartado 2.6.2** de la Introducción (Capítulo I), la microextracción en fase sólida también se ha empleado con éxito en el análisis de diversos pesticidas (carbamatos, triazinas, organofosforados y organoclorados) en suelo; sin embargo, hasta el momento, no se tiene conocimiento de trabajos previos en los que se haya aplicado la SPME a la **extracción de piretroides** de esta matriz.

El **objetivo** de este estudio es el desarrollo de un método basado en la **SPME** para la determinación simultánea de **36 pesticidas** (piretroides y organoclorados, en su mayoría) en suelo, utilizando el acoplamiento **GC- μ ECD** como técnica de separación y detección.

A lo largo de este capítulo se discuten los resultados obtenidos en la **optimización** del proceso de extracción. A continuación se estudian los **parámetros analíticos de calidad** del método propuesto y, finalmente, éste se aplica al análisis de **muestras de suelo reales**.

1.1 PARTE EXPERIMENTAL

1.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS

Para el desarrollo y validación del método se utilizaron varias **muestras de suelo** (A-G) recogidas en diferentes puntos de Galicia. En la Tabla IV.1.1 se han incluido algunas de las propiedades de estas muestras, como son el origen (jardín o zona agrícola), los porcentajes de materia seca (%MS) y de materia orgánica (%MO), así como los cocientes entre ambos valores (MO/MS).

Tabla IV.1.1 Propiedades de las muestras de suelo utilizadas en el desarrollo y validación del método.

Código	Origen	%MS	%MO	MO/MS
A	jardín	99,1	7,4	7,4
B	jardín	97,9	13,4	13,7
C	agrícola	95,4	9,9	10,4
D	agrícola	98,2	9,6	9,8
E	agrícola	97,9	8,5	8,7
F	agrícola	98,4	8,6	8,8
G	agrícola	97,6	10,9	11,2

Después de eliminar el material extraño, las muestras de suelo se secaron a 40 °C, se molieron y se tamizaron por un tamiz de luz de malla de 2 mm. Todas ellas se mantuvieron en el congelador hasta el momento de su utilización.

Para los estudios de optimización, se adicionaron 10 ng g⁻¹ de los pesticidas organoclorados, teflutrina y transflutrina, y 50 ng g⁻¹ de los restantes analitos a la muestra de suelo A. Para ello, se pesaron 30 g de dicha muestra en un vaso de precipitados grande y se adicionaron 15 mL de una disolución de 20/100 ng mL⁻¹ (organoclorados, teflutrina, transflutrina/restantes analitos) en acetona, de tal manera que toda la muestra quedó completamente cubierta con disolvente orgánico. Esta suspensión se dejó en una campana de extracción (apagada) hasta que el disolvente se evaporó por completo (9-12 h). La mezcla se agitó ocasionalmente con una varilla de vidrio para deshacer los grumos formados y dicha varilla se lavó con acetona sobre la propia muestra para evitar posibles pérdidas. Análogamente, se preparó un blanco de la muestra A pesando una porción de la misma y añadiendo el mismo porcentaje de

acetona que en la muestra fortificada. A continuación, se tomaron fracciones de 0,5 g de dicha muestra (fortificada y blanco) y se mantuvieron en el congelador hasta 5-10 min antes de su análisis. Para la evaluación de los parámetros analíticos de calidad del método se prepararon alícuotas de la misma muestra de suelo (A) fortificadas a diferentes niveles de concentración (0,5-200 ng g⁻¹). Las adiciones sobre las muestras de suelo se realizaron de manera que la cantidad de disolvente orgánico (acetona) en cada muestra fuera constante independientemente del nivel de concentración.

Para el estudio del efecto matriz, las muestras A-G se fortificaron a un nivel de 5/25 ng g⁻¹.

Finalmente, para la validación del método se utilizó un **material de referencia certificado** (RTC-CRM818-050) suministrado por la RTC (*Resource Technology Corporation*). Este material es un suelo con un contenido certificado en 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, aldrina, α -lindano, β -lindano, γ -lindano, dieldrina, endosulfán I, endosulfán II, sulfato de endosulfán, endrina, heptacloro y metoxicloro.

1.1.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. SPME

En la Figura IV.1.1 se muestra un esquema del **procedimiento general** empleado para la extracción de pesticidas en muestras de suelo mediante SPME.

En primer lugar, se coloca una fracción de 0,5 g de muestra de suelo en un vial de 10 mL. Según el experimento a realizar, se añade el volumen correspondiente de disolvente (agua, acetona, agua:acetona) y la cantidad oportuna de NaCl (0-20%, m/v). A continuación se introduce un clavo de acero, se cierra el vial con una cápsula de aluminio y un septum con la cara interior recubierta de Teflón, y se mete el vial en un baño de agua (situado sobre una placa agitadora y calefactora) a la temperatura de trabajo. El vial se mantiene en el baño durante 5 min para su termostatización. Seguidamente, se perfora el septum para poder introducir la fibra de SPME en el vial y ésta se expone al espacio de cabeza sobre la muestra. Tras 30 min de extracción, la fibra se retrae en el soporte y se desorbe térmicamente durante 5 min en el inyector del cromatógrafo de gases.

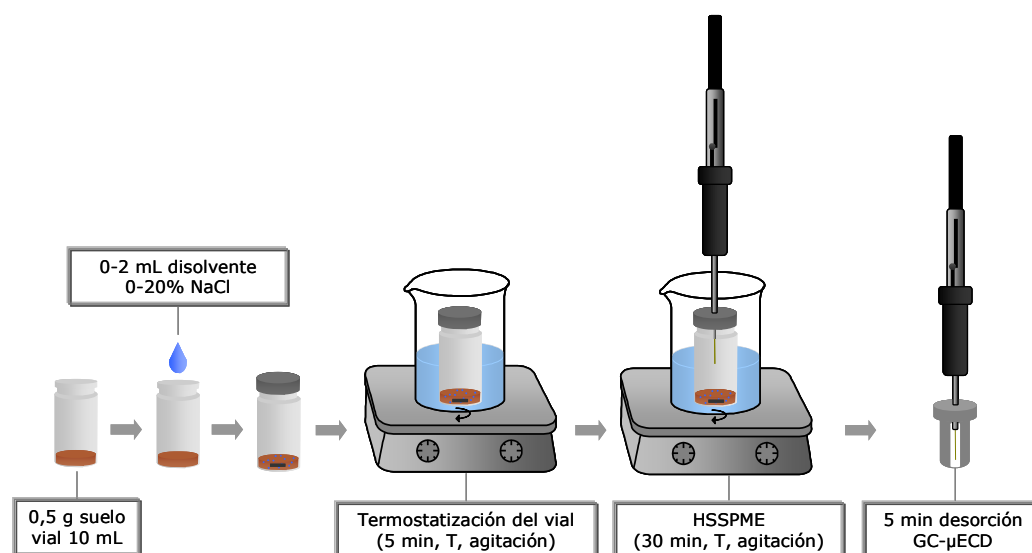


Figura IV.1.1 Esquema de extracción para la determinación de pesticidas en suelo por SPME.

1.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES

Para el análisis de los pesticidas se empleó un **cromatógrafo de gases** Hewlett-Packard modelo 6890, equipado con un detector **^{63}Ni de microcaptura electrónica** (μECD) y provisto de un inyector split/splitless. Para el control del equipo y la adquisición y tratamiento de los datos se utilizó el programa informático GC Chemstation.

Las **condiciones instrumentales** utilizadas en este estudio se resumen en la Tabla IV.1.2.

Tabla IV.1.2 Condiciones instrumentales empleadas en el GC- μ ECD para la determinación en suelo de los pesticidas investigados.

GC-μECD	
INYECTOR	Split/splitless
Temperatura	260-290 °C
Modo de inyección	splitless
Tiempo de purga	2 min
COLUMNA	HP-5MS
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m
PROGRAMA DE TEMPERATURAS	
Temperatura inicial	60 °C (2 min)
Rampa de temperatura 1	30 °C min ⁻¹ hasta 200 °C
Rampa de temperatura 2	3 °C min ⁻¹ hasta 230 °C
Rampa de temperatura 3	4 °C min ⁻¹ hasta 300 °C
Tiempo total de análisis	34,17 min
GAS PORTADOR	He
Presión en cabeza de columna	9,92 psi
Flujo en columna	1 mL min ⁻¹ (constante)
DETECTOR	
Temperatura	300 °C
Gas auxiliar	N ₂
Flujo de gas auxiliar	30 mL min ⁻¹

La temperatura del inyector varió en función de la fibra de SPME empleada en cada caso: 260 °C para CW-DVB, 270 °C para PDMS-DVB, 280 °C para PDMS y 290 °C para PA y CAR-PDMS.

Para confirmar resultados positivos en algunas muestras reales y cuantificar el material de referencia se realizaron análisis por **GC-MS**. Para ello se utilizó un **cromatógrafo de gases** Varian 3400 CX equipado con un inyector split/splitless Varian 1079 y acoplado a un detector de **espectrometría de masas de trampa de iones** Varian Saturn 3. Para el control del equipo y la adquisición y procesamiento de los datos se utilizó el programa Saturn GC/MS Workstation v5.4. La ionización se llevó

a cabo por impacto electrónico (EI) positivo (+70 eV). Se trabajó en modo *full scan* en el rango de masas 45-500 m/z, a una velocidad de barrido de 0,6 s scan⁻¹.

1.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Los primeros experimentos realizados en este estudio se centraron en la optimización de la **separación cromatográfica** de los pesticidas investigados. Para ello, en estas primeras pruebas se inyectaron alícuotas de 2 µL de patrones individuales y de mezclas de los mismos para así poder identificar todos los compuestos mediante sus tiempos de retención. Después de evaluar diferentes programas de temperatura (ver las condiciones finales seleccionadas en el **Apartado 1.1.3**), se consiguió una

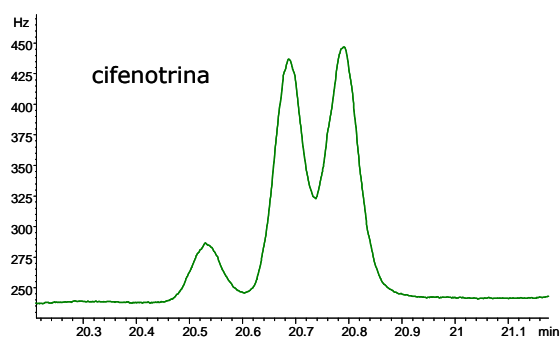


Figura IV.1.2 Cluster de picos cromatográficos de la cifenotrina.

separación cromatográfica satisfactoria de todos los analitos en un **tiempo de análisis corto** (34,17 min). Tal y como se ha mencionado en el Capítulo III (**Apartado 1**), algunos de los **piretroides** se han adquirido como mezclas de isómeros (p.ej. cifenotrina, ciflutrina, cipermetrina) dando lugar a **clusters de picos** cromatográficos (ver Figura IV.1.2 para la cifenotrina).

Estos piretroides han sido cuantificados como la suma de los isómeros. En la Tabla IV.1.3 se han incluido los **tiempos de retención (t_r)** para cada compuesto correspondientes a las condiciones cromatográficas finalmente seleccionadas.

Tabla IV.1.3 Tiempos de retención (t_r) de los pesticidas estudiados bajo las condiciones indicadas en la Tabla IV.1.2.

pesticida	t_r (min)	pesticida	t_r (min)	pesticida	t_r (min)
α -Lindano	8,1	Epóxido de heptacloro	11,0	4,4'-DDT	15,1
β -Lindano	8,4	Aletrina	11,2	Cetona de endrina	16,6
γ -Lindano	8,5	γ -Clordano	11,6	Tetrametrina	17,3
Teflutrina	8,7	Endosulfán I	11,9	Metoxicloro	17,4
δ -Lindano	8,8	α -Clordano	12,0	λ -Cihalotrina	19,2-19,7
Acetocloro	9,3	4,4'-DDE	12,5	Cifenotrina	20,5-20,8
Transflutrina	9,4	Dieldrina	12,6	Permetrina	21,2-21,5
Alacloro	9,4	Endrina	13,2	Ciflutrina	22,7-23,2
Heptacloro	9,5	Endosulfán II	13,5	Cipermetrina	23,7-24,0
Fenitrothion	9,8	4,4'-DDD	13,8	Flucitrinato	24,4
Aldrina	10,2	Aldehído de endrina	14,1	Fenvalerato	25,5-26,0
Clorpirifos	10,3	Sulfato de endosulfán	14,9	Deltametrina	26,7-27,2

1.2.2 EXPERIMENTOS PREVIOS DE SPME

1.2.2.1 Influencia del incremento de la temperatura de extracción y de la adición de disolvente

El suelo es una **matriz compleja** que contiene sustancias capaces de dañar o cambiar las propiedades de la fase de la fibra, particularmente a través de procesos de adsorción. Para evitar estos problemas, en este trabajo se optó desde el principio por el muestreo en espacio de cabeza (**HSSPME**). Sin embargo, dado que los pesticidas analizados son compuestos semivolátiles, cabe esperar que el reparto de dichos compuestos entre el suelo y el espacio de cabeza sea bajo. Por eso, se buscó la manera de **promover la desorción** de los analitos de la muestra y, de este modo, incrementar su presencia en el espacio de cabeza. Con este propósito se evaluó la influencia de dos factores: el incremento de la temperatura de extracción y la adición de una pequeña cantidad de disolvente. En estos experimentos preliminares se trabajó con una fibra de PDMS.

Como ya se adelantó en el **Apartado 2.5.3** de la Introducción (Capítulo I), en la SPME, un **incremento de la temperatura** facilita la transferencia de masa y el paso

de los analitos desde la matriz al espacio de cabeza. No obstante, temperaturas elevadas también pueden afectar negativamente a la ad/absorción de los analitos en la fase de la fibra debido a un descenso de las correspondientes constantes de distribución. De manera que lo mejor en estos casos es evaluar experimentalmente la influencia de la temperatura de extracción. Con este objetivo se hicieron una serie de pruebas añadiendo 1 mL de agua a cada alícuota de suelo de 0,5 g y extrayendo a dos temperaturas: 25 °C (temperatura ambiente) y 100 °C. Al comparar los resultados, se observó que las respuestas obtenidas en los experimentos a **25 °C** eran muy bajas e incluso despreciables con respecto a las obtenidas a **100 °C**; de hecho, λ -cihalotrina, cifenotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina, flucitrinato, fenvalerato y deltametrina no se detectaron en las pruebas realizadas a temperatura ambiente. Por lo tanto, estas pruebas evidenciaron la necesidad de un incremento de la temperatura (por encima de la ambiente) para conseguir la extracción de **todos** los pesticidas investigados. La **temperatura de extracción** se volvió a evaluar, junto con otros parámetros, mediante un diseño experimental (**Apartado 1.2.3**).

La **adición de una pequeña cantidad de disolvente polar** fue otro de los parámetros evaluados. Se realizaron una serie de experimentos (100 °C) a fin de evaluar la influencia de la adición de 1 mL de agua a las muestras de suelo. Se observó que las respuestas obtenidas para todos los analitos al no añadir agua estaban por debajo (más de un 95% inferiores para la mayoría de los pesticidas) de las obtenidas al añadir 1 mL de agua.

A continuación se estudió la influencia de la adición de diferentes disolventes polares comparando las respuestas obtenidas al añadir: **1 mL de agua**, **1 mL de agua:acetona (1:1, v/v)** y **1 mL de acetona**. Los resultados obtenidos para algunos de los pesticidas objetivo se muestran en la Figura IV.1.3. En general se obtuvieron mayores áreas de pico al añadir 1 mL de agua, mientras que las respuestas obtenidas en presencia de acetona fueron considerablemente menores. Sólo en el caso de los isómeros del lindano (ver α -lindano en la Figura IV.1.3) se obtuvieron señales similares o superiores al trabajar con 1 mL de acetona en comparación con los experimentos realizados con adición de agua. El incremento de sensibilidad observado al añadir agua al suelo se puede atribuir a la competición entre el agua y los analitos por los puntos activos de adsorción de la matriz, y también a la baja solubilidad en

agua de los pesticidas estudiados [13]. Por tanto, en las extracciones posteriores **se añadió agua** a las muestras de suelo analizadas.

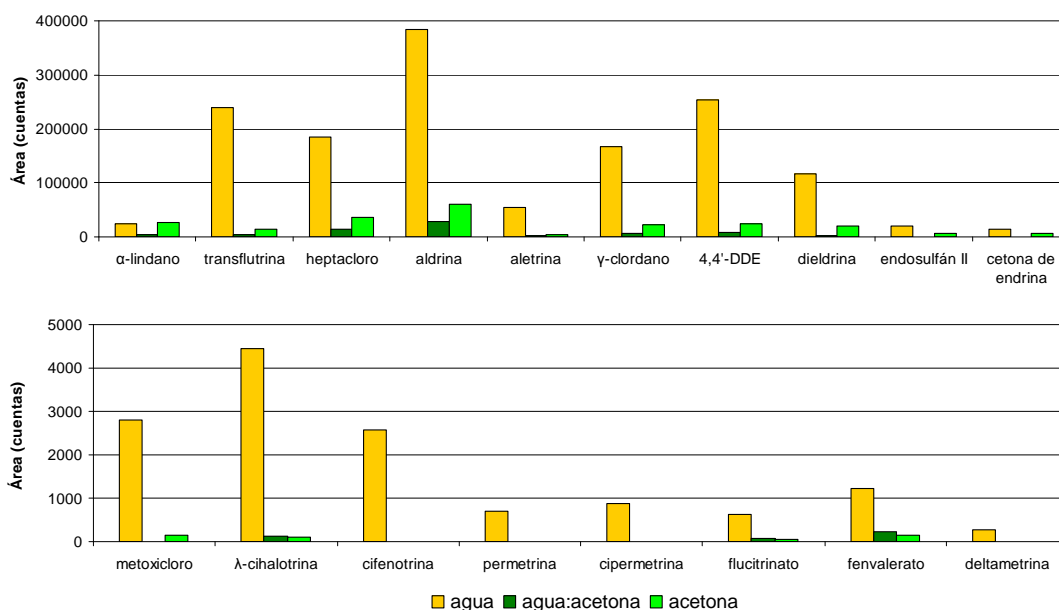


Figura IV.1.3 Influencia de la adición de diferentes disolventes a las muestras de suelo en la HSSPME de algunos de los pesticidas investigados.

1.2.2.2 Selección de fibras

Como se verá en el **Apartado 1.2.3**, la optimización del método de HSSPME desarrollado se llevó a cabo utilizando herramientas quimiométricas, siendo la **naturaleza de la fibra** una de las variables estudiadas. No obstante, se plantearon una serie de pruebas previas con el objetivo de reducir el número de niveles de este factor (fibra) a incluir en el diseño experimental. Con este fin, se realizaron varias extracciones (a 100 °C y adicionando 1 mL de agua a las muestras de suelo) utilizando cinco fibras de SPME comerciales: PDMS, PA, PDMS-DVB, CAR-PDMS y CW-DVB. La Figura IV.1.4 ilustra la influencia del recubrimiento polimérico de estas fibras en la respuesta de algunos de los analitos. Se observó que, en general, con **PDMS-DVB** y **CAR-PDMS** se obtienen resultados similares y que ambas fibras muestran, en comparación con las restantes, un incremento significativo en la señal para el caso de los lindanos, aldrina, teflutrina (ver estos dos últimos compuestos y γ-lindano en la

figura) y transflutrina. Por otro lado, **CW-DVB** proporcionó los mejores resultados sólo para la endrina, pero mostró una eficacia de adsorción muy baja para aldehído de endrina, cetona de endrina, λ -cihalotrina, ciflutrina, cipermetrina, flucitrinato, fenvalerato y deltametrina (ver endrina y otros ejemplos en la figura), por lo que esta fibra se descartó para los experimentos posteriores.

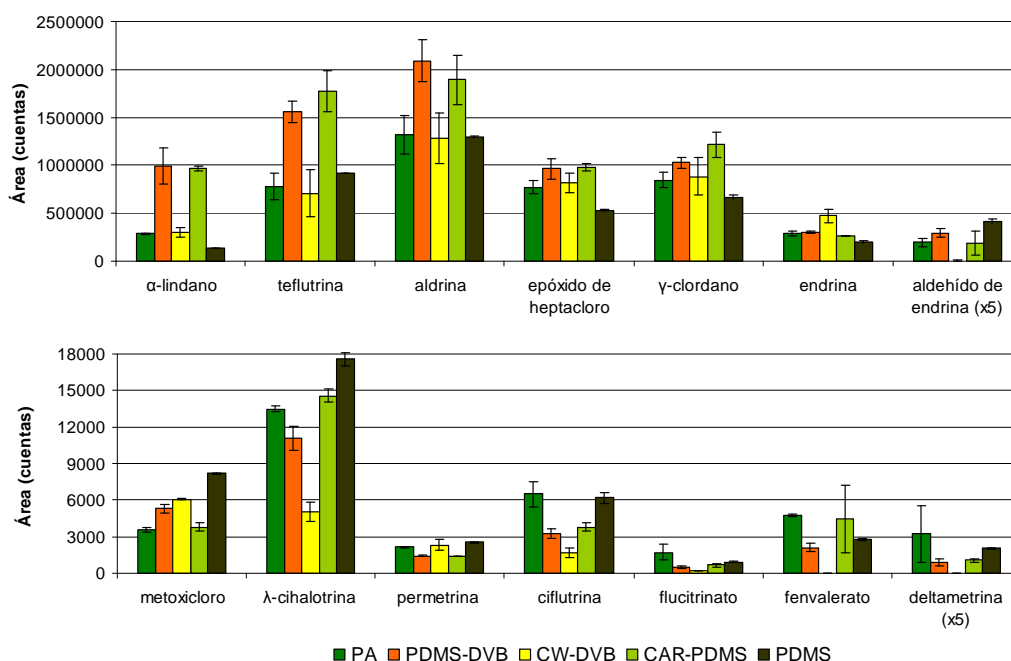


Figura IV.1.4 Influencia de las fibras investigadas en la HSSPME de algunos de los pesticidas estudiados. Las respuestas del aldehído de endrina y de la deltametrina se han multiplicado por cinco.

En cuanto a las fibras de **PA** y **PDMS**, éstas fueron las más adecuadas para la extracción de los piretroides menos volátiles (ver permetrina, ciflutrina, flucitrinato, fenvalerato y deltametrina en la figura). Se debe tener en cuenta que el incremento de respuesta es especialmente necesario en el caso de estos últimos compuestos, ya que todos ellos presentan una relación señal/ruido muy baja en comparación con los restantes pesticidas. Es por eso que se decidió incluir a las fibras de PA y PDMS en el diseño experimental. Finalmente, la fibra de **PDMS-DVB** también fue seleccionada en detrimento de la fibra de CAR-PDMS puesto que esta fibra puede resultar problemática dado que a menudo conduce a desorciones incompletas, picos con cola y a una variabilidad importante entre fibras.

1.2.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SPME: DISEÑO FACTORIAL

Se recurrió a un **diseño factorial** con el objetivo de determinar las condiciones experimentales óptimas para la extracción de los pesticidas investigados en suelo mediante HSSPME. De este modo se lograron definir las mejores condiciones con un pequeño número de experimentos. En este estudio se consideraron cuatro variables: recubrimiento de la fibra (A), temperatura de extracción (B), adición de cloruro sódico (C), y volumen de agua (D). Todos los factores se estudiaron a dos niveles, salvo el recubrimiento de la fibra, evaluado a tres niveles (Tabla IV.1.4).

Tabla IV.1.4 Factores y niveles evaluados mediante el diseño experimental.

Factor	Código	Nivel bajo (-)	Nivel central	Nivel alto (+)	Continuo
Recubrimiento de fibra	A	PDMS-DVB	PDMS	PA	No
Temperatura de extracción (°C)	B	60		100	Sí
NaCl (% m/v)	C	0		20	Sí
Volumen de agua (mL)	D	0.5		2	Sí

Sobre la base de los experimentos preliminares (**Apartado 1.2.2**), se estudiaron tres recubrimientos poliméricos: PDMS-DVB, PDMS y PA (puesto que se trata de un factor adimensional, los niveles alto, bajo y central han sido asignados arbitrariamente). La temperatura de extracción se investigó a los niveles 60 y 100 °C, ya que las respuestas a 25 °C fueron muy bajas. Como ya se justificó antes, el agua fue el disolvente seleccionado para humedecer las muestras de suelo y su volumen se estudió a dos niveles, 0,5 y 2 mL. Finalmente, la adición de NaCl podría promover la eficacia de la extracción, por lo que también se evaluó a dos niveles, 0 y 20% (m/v).

En lugar de realizar un diseño factorial completo que requeriría 24 análisis, se optó por un **diseño factorial fraccionado de nivel mixto ($3 \cdot 2^{3-1}$)** que redujo a la mitad el número de experimentos (12) sin que con ello se perdiera demasiada información. De hecho, el diseño propuesto tiene **resolución V**, lo que quiere decir que permite la evaluación de todos los efectos principales y de las interacciones entre dos factores.

En la Tabla IV.1.5 se muestra la **matriz de experimentos** del diseño realizado generada por el programa estadístico Statgraphics-Plus. En esta tabla se indican las condiciones experimentales de cada uno de los análisis. Además, en cada una de estas experiencias se han considerado fijos varios factores: el tamaño de muestra (0,5 g), el modo de muestreo (HSSPME), el tiempo de extracción (30 min) y la agitación constante.

Tabla IV.1.5 Matriz de experimentos del diseño factorial fraccionado de nivel mixto ($3 \cdot 2^{3-1}$).

Experiencia	Recubrimiento de fibra	Temperatura de extracción (°C)	NaCl (% m/v)	Volumen de agua (mL)
1	PDMS	100	0	0,5
2	PDMS	100	20	2
3	PDMS	60	20	0,5
4	PDMS	60	0	2
5	DVB	100	0	2
6	DVB	100	20	0,5
7	DVB	60	20	2
8	DVB	60	0	0,5
9	PA	100	0	2
10	PA	100	20	0,5
11	PA	60	20	2
12	PA	60	0	0,5

Una vez introducidos los datos de los experimentos realizados en el programa Statgraphics-Plus, éste proporcionó una serie de **herramientas estadísticas** que facilitaron la interpretación de los resultados, como son: las cartas Pareto, los gráficos de efectos principales y los gráficos de interacciones.

1.2.3.1 Cartas Pareto y gráficos de efectos principales

Las **cartas Pareto** son gráficos que representan mediante barras horizontales en qué medida afecta cada uno de los factores (o interacciones entre factores) a la eficacia del procedimiento estudiado. La longitud de las barras es proporcional al efecto del factor o interacción considerado. Además, estos gráficos incluyen una línea vertical correspondiente al límite de significación establecido para el **nivel de confianza**

seleccionado, en este caso del **95%**. De este modo, se considera significativo todo aquel factor o interacción cuya barra supere dicha línea.

Con el fin de simplificar la presentación de los resultados, en la Figura IV.1.5 se muestran sólo las cartas Pareto obtenidas para cuatro de los pesticidas investigados, representativas del comportamiento general mostrado por todos los analitos.

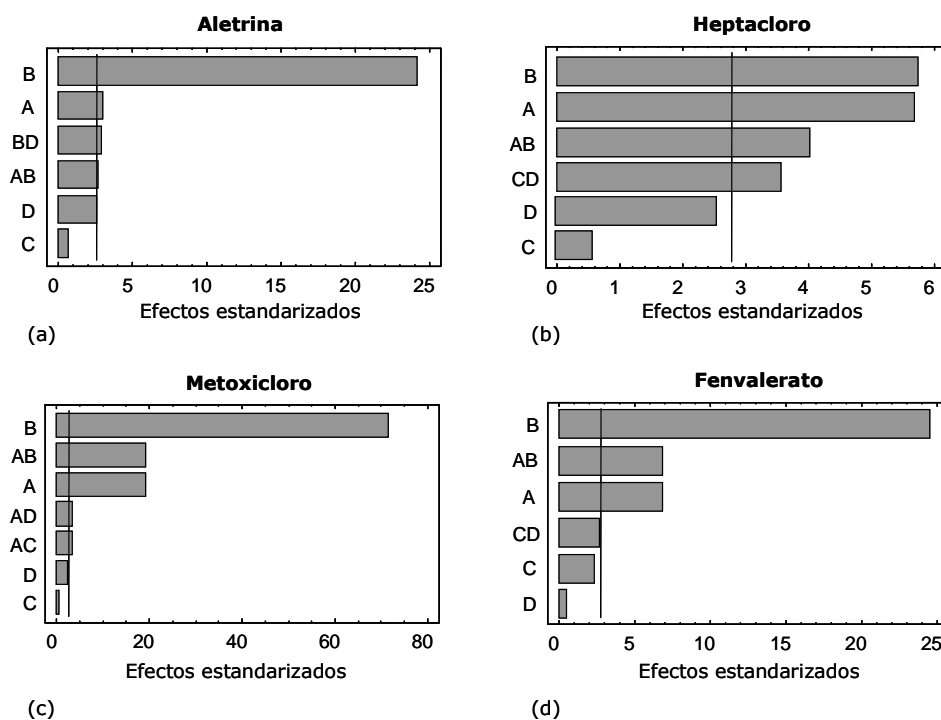


Figura IV.1.5 Cartas Pareto para algunos pesticidas seleccionados:
(a) aletrina; (b) heptacloro; (c) metoxicloro; (d) fenvalerato.

En un **gráfico de efectos principales** se muestra la influencia de cada uno de los factores evaluados. En este tipo de gráfica se representan una serie de líneas que unen el nivel inferior y superior para cada uno de los factores estudiados, tal y como se observa en la Figura IV.1.6 para cuatro de los analitos.

La influencia de cada variable viene dada por la longitud y la pendiente de su correspondiente línea. Una pendiente positiva implica un aumento de la eficacia del proceso estudiado al pasar del nivel bajo al nivel alto. Por el contrario, una pendiente

de signo negativo implica que la eficacia del proceso se ve favorecida en el sentido inverso. En cuanto a la longitud, un factor tiene mayor efecto en el proceso estudiado cuanto mayor sea la longitud de la línea.

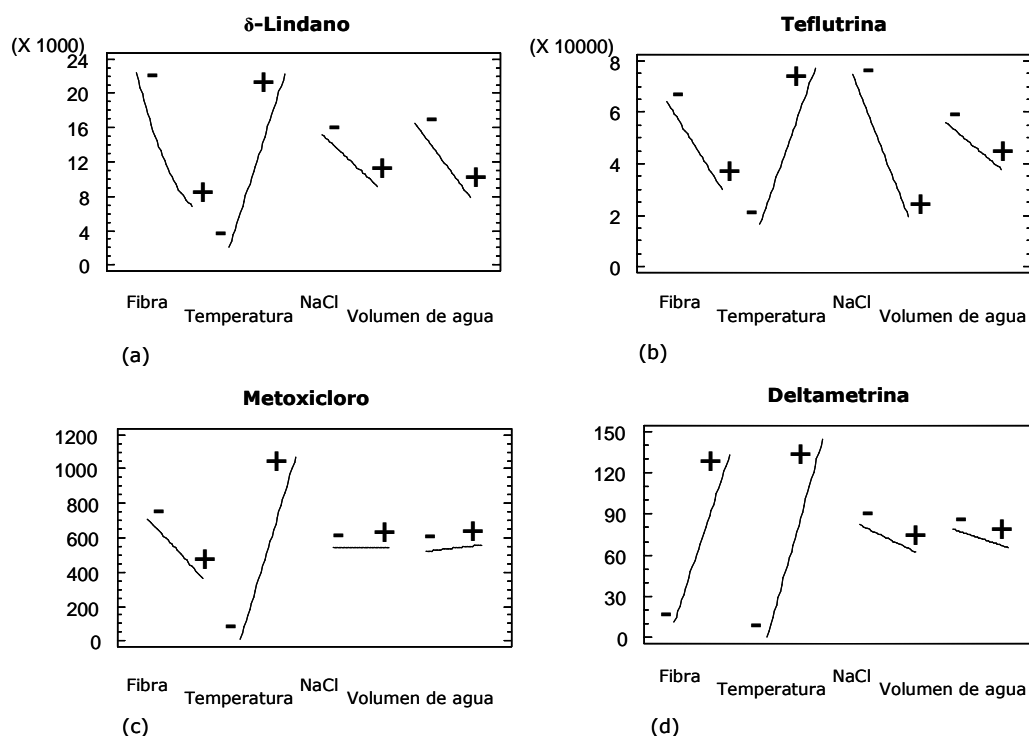


Figura IV.1.6 Gráficos de efectos principales para algunos pesticidas seleccionados: (a) δ -lindano; (b) teflutrina; (c) metoxicloro; (d) deltametrina.

Tal y como se deduce de las cartas Pareto (Figura IV.1.5), la **temperatura de extracción** (B) fue la variable más importante, con un efecto significativo para todos los compuestos estudiados. En los gráficos de efectos principales (Figura IV.1.6) se observa que las rectas para este factor son largas y que en todos los casos presentan una pendiente positiva. Esto indica que se obtienen respuestas más altas al trabajar a la temperatura más alta (100 °C).

El siguiente factor más influyente fue el **recubrimiento de la fibra** (A) que fue estadísticamente significativo para la mayoría de los pesticidas. La fibra PDMS-DVB condujo a los mejores resultados para los pesticidas organoclorados, teflutrina, transflutrina y aletrina (ver algunos ejemplos en la Figura IV.1.6). Sin embargo, en el

caso de los piretroides menos volátiles, se obtuvieron mejores respuestas al trabajar con la fibra de PA (ver deltametrina en la Figura IV.1.6). Finalmente, PA fue elegido como el recubrimiento más adecuado para conseguir una sensibilidad aceptable para la extracción simultánea de todos los compuestos investigados, aunque es evidente que la fibra de PDMS-DVB conduce a mayores áreas cromatográficas para un mayor número de analitos. Se adoptó esta solución de compromiso puesto que el uso de la fibra de PDMS-DVB supondría una importante pérdida de sensibilidad para los piretroides menos volátiles, mientras que para los restantes compuestos se consiguen límites de detección por debajo del ng g^{-1} independientemente de la fibra empleada (PA o PDMS-DVB).

En lo que respecta a la **adición de NaCl** (C), fue un factor significativo para varios analitos (ver teflutrina en la Figura IV.1.6). En todos estos casos se obtuvieron mejores respuestas trabajando al nivel bajo (0% NaCl). Se puede concluir, por tanto, que la adición de NaCl no promueve el efecto salino en las muestras estudiadas.

Finalmente, el **volumen de agua** (D) fue significativo para pocos pesticidas, entre los cuales se encuentran el 4,4'-DDD y la teflutrina. En estos casos, las mejores recuperaciones se obtuvieron al añadir 0,5 mL de agua a las muestras de suelo.

1.2.3.2 Gráficos de interacciones

En los **gráficos de interacciones** se representan un par de líneas para cada interacción, líneas correspondientes a la respuesta predicha cuando uno de los factores varía de su nivel bajo al alto, a cada uno de los niveles del otro factor y manteniendo a los restantes factores (que no intervienen en la interacción) en su nivel central.

Tal y como se deduce de la Figura IV.1.5, algunas interacciones fueron significativas para varios de los pesticidas estudiados. Algunas de estas interacciones se han representado en la Figura IV.1.7.

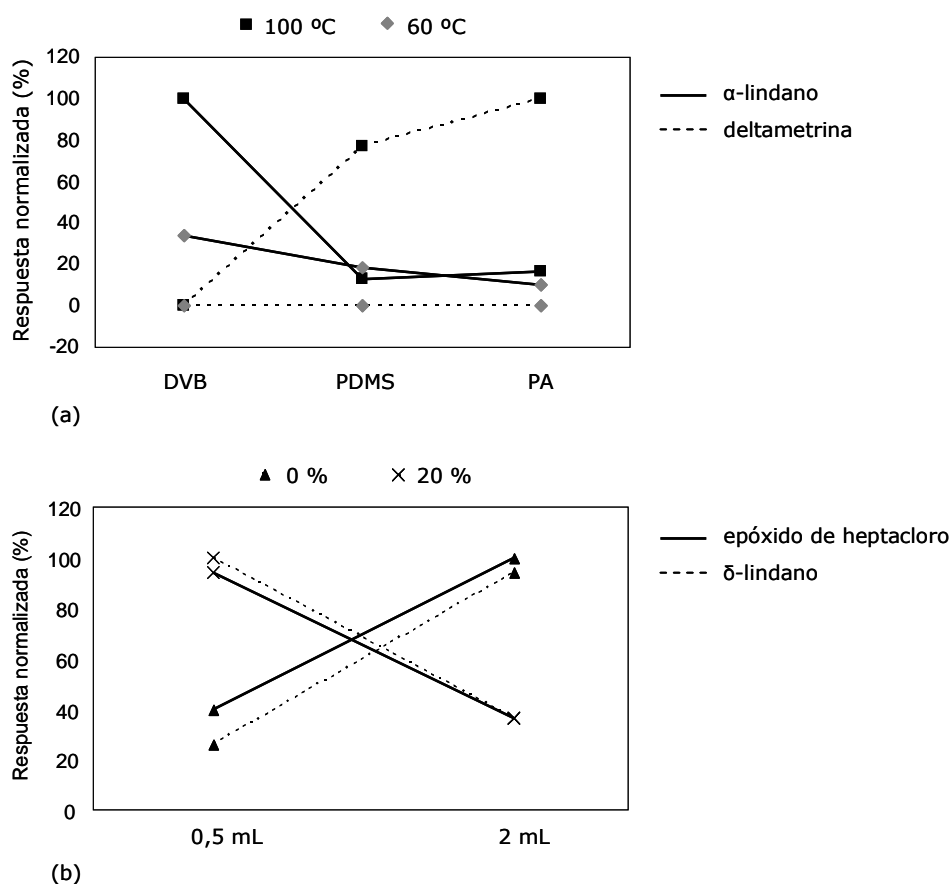


Figura IV.1.7 (a) Gráficos de la interacción recubrimiento de fibra-temperatura de extracción (AB) para el α -lindano y la deltametrina. (b) Gráficos de la interacción NaCl-volumen de agua (CD) para el epóxido de heptacloro y el δ -lindano. Las respuestas se han normalizado a la respuesta máxima de cada compuesto.

La **interacción recubrimiento de fibra-temperatura de extracción** (AB) fue significativa para varios analitos aunque no de la misma manera. En el caso de los pesticidas organoclorados, las respuestas fueron mayores a 100 °C que a 60 °C independientemente de la fibra, pero las diferencias entre estas respuestas fueron generalmente mayores al trabajar con PDMS-DVB (ver α -lindano en la Figura IV.1.7). Por otro lado, las respuestas a 60 °C y/o utilizando fibras de DVB fueron muy bajas e incluso insignificantes en el caso de los piretroides menos volátiles (ver deltametrina en la Figura IV.1.7).

Para algunos de los pesticidas investigados, la **interacción NaCl-volumen de agua** (CD) también fue significativa. En estos casos (ver epóxido de heptacloro y δ -lindano en la Figura IV.1.7), las repuestas con 0% de NaCl fueron mayores al añadir 2 mL de agua, mientras que con un 20% de NaCl las respuestas mejoraron al añadir sólo 0,5 mL de agua.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se propuso un **método definitivo** para la extracción simultánea de los 36 pesticidas investigados. En la Tabla IV.1.6 se recogen los niveles óptimos para cada uno de los factores evaluados mediante el diseño experimental, así como las variables que se han considerado fijas durante estos experimentos.

Tabla IV.1.6 Niveles óptimos de los factores estudiados y variables fijas.

Factores estudiados	Óptimo
Recubrimiento de fibra	PA
Temperatura de extracción (°C)	100
NaCl (% m/v)	0
Volumen de agua (mL)	0,5
Factores fijos	
Tamaño de muestra (g)	0,5
Volumen de vial (mL)	10
Tiempo de exposición (min)	30
Agitación	Sí
Modo de muestreo	HSSPME

En la Figura IV.1.8 se muestra el **cromatograma** obtenido en el GC- μ ECD correspondiente a la HSSPME, bajo las condiciones recomendadas (Tabla IV.1.6), de la muestra de suelo A con adición de 5 ng g⁻¹ de los pesticidas organoclorados, teflutrina y transflutrina, y de 25 ng g⁻¹ de los restantes compuestos.

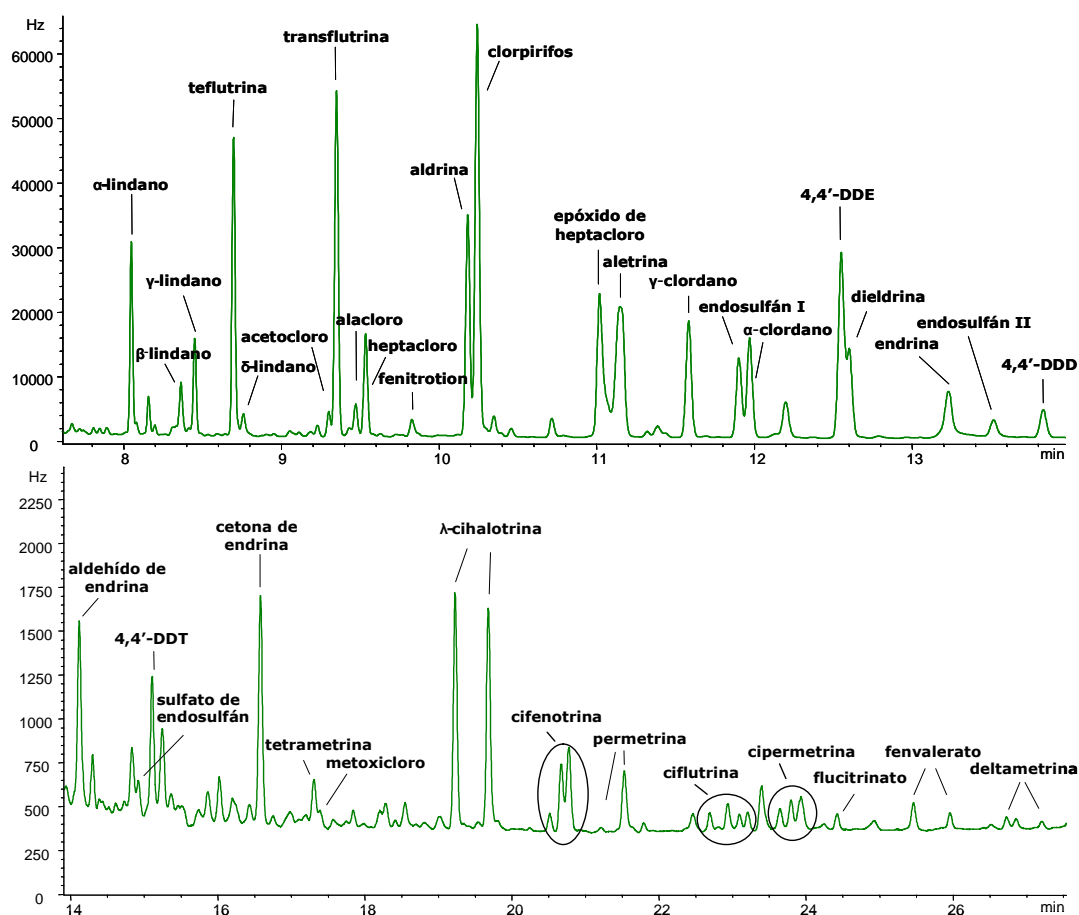


Figura IV.1.8 Cromatograma HSSPME-GC- μ ECD de la muestra de suelo A (con adición de 5 ng g^{-1} de los pesticidas organoclorados, teflutrina y transflutrina, y de 25 ng g^{-1} de los restantes compuestos) obtenido siguiendo el método propuesto.

1.2.4 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO

Los parámetros analíticos de calidad evaluados han sido precisión, linealidad y límites de detección y cuantificación (Tabla IV.1.7). Todos ellos se han medido utilizando muestras de suelo con adición de concentraciones conocidas de los pesticidas investigados.

Tabla IV.1.7 Precisión, linealidad, límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) y recuperaciones del método propuesto.

Pesticida	Repetibilidad (RSD, %)	Linealidad		LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recuperación (%)
		rango (ng/g)	R			
α -Lindano	6,9	0,5-100	0,9998	0,004	0,013	88
β -Lindano	3,5	0,5-100	0,9991	0,020	0,067	85
γ -Lindano	10	0,5-100	0,9996	0,015	0,051	74
Teflutrina	3,7	0,5-100	0,9990	0,004	0,012	109
δ -Lindano	7,8	0,5-100	0,9985	0,045	0,15	80
Acetocloro	0,5	5-200	0,9999	0,15	0,51	75
Transflutrina	1,2	0,5-100	0,9944	0,009	0,031	123
Alacloro	9,7	5-200	0,9985	0,13	0,42	121
Heptacloro	6,3	0,5-100	0,9996	0,018	0,061	102
Fenitrotion	13	5-200	0,9939	0,16	0,52	147
Aldrina	3,4	0,5-100	0,9998	0,012	0,041	66
Clorpirifos	1,1	0,5-100	0,9995	0,033	0,11	75
Epóxido de heptacloro	9,6	0,5-100	0,9999	0,016	0,052	92
Aletrina	3,2	5-200	0,9956	0,069	0,23	82
γ -Clordano	2,8	0,5-100	0,9999	0,010	0,033	94
Endosulfán I	3,5	0,5-100	0,9999	0,027	0,089	73
α -Clordano	1,0	0,5-100	0,9999	0,022	0,072	71
4,4'-DDE	2,7	0,5-100	0,9998	0,014	0,045	80
Dieldrina	6,5	0,5-100	0,9999	0,028	0,094	83
Endrina	5,8	0,5-100	0,9999	0,010	0,032	92
Endosulfán II	7,7	0,5-100	0,9997	0,022	0,073	128
4,4'-DDD	4,2	0,5-100	0,9999	0,012	0,041	74
Aldehído de endrina	5,2	0,5-100	0,9988	0,15	0,51	89
Sulfato de endosulfán	11	1-100	0,9969	0,36	1,2	88
4,4'-DDT	1,3	0,5-100	0,9975	0,19	0,62	95
Cetona de endrina	8,8	0,5-100	0,9998	0,033	0,11	91
Tetrametrina	13	5-200	0,9988	0,91	3,0	106
Metoxicloro	4,0	5-100	0,9988	0,90	3,0	89
λ -Cihalotrina	5,1	5-200	0,9970	0,16	0,52	75
Cifenotrina	5,9	5-200	0,9969	0,36	1,2	122
Permetrina	2,9	5-200	0,9982	0,45	1,5	95
Ciflutrina	4,9	5-200	0,9963	0,91	3,0	97
Cipermetrina	3,0	5-200	0,9967	0,75	2,5	98
Flucitrinato	4,6	5-200	0,9977	1,2	4,0	93
Fenvalerato	2,0	5-200	0,9962	0,75	2,5	94
Deltametrina	14	5-200	0,9991	1,2	4,0	81

La **linealidad** del método propuesto se evaluó realizando un estudio de calibración en muestras de suelo, considerando entre 5 y 7 niveles de concentración. El intervalo de concentraciones considerado para cada compuesto se especifica en la Tabla IV.1.7, y cada uno de los niveles se analizó al menos por duplicado. De los datos incluidos en la tabla, se deduce que existe una buena relación lineal entre las respuestas analíticas obtenidas y las concentraciones de pesticida, con coeficientes de correlación (R) entre 0,9939 y 0,9999.

Los datos de **precisión**, expresada matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD), también se muestran en la Tabla IV.1.7. Estos valores se calcularon a

partir de los datos obtenidos para cuatro réplicas ($n=4$) de una muestra de suelo fortificada (10 ng g^{-1} de los pesticidas organoclorados, teflutrina y transflutrina, 50 ng g^{-1} de los restantes compuestos). Se obtuvieron valores de RSD satisfactorios para todos los compuestos, comprendidos entre 1,0 y 14% y con una media del 5,6%.

En la Tabla IV.1.7 también se recogen los **límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs)** para el método propuesto. Existen diversos modos de calcular los LODs y LOQs. En este trabajo se han calculado como la concentración correspondiente a una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. Estos límites se estimaron considerando los cromatogramas obtenidos para los niveles de concentración más bajos, en los que el ruido de fondo se calculó integrando picos de ruido en zonas de los cromatogramas próximas a cada uno de los picos de los analitos estudiados y promediando después las áreas obtenidas para esos picos de ruido.

Se obtuvieron LODs por debajo del ng g^{-1} para todos los pesticidas salvo para la deltametrina y el flucitrinato ($1,2 \text{ ng g}^{-1}$). Estos límites de detección son comparables o mejores que los obtenidos por otros autores [5, 7, 14-18] y además son muy inferiores a los niveles de referencia establecidos por la legislación española (ver Tabla I.1.3 de la Introducción).

1.2.5 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD

Para evaluar la **influencia de la naturaleza del suelo** en el método HSSPME-GC- μ ECD propuesto se emplearon 7 muestras de suelo (A-G, ver Tabla IV.1.1), dos de ellas de jardín (A y B) y las cinco restantes (C-G) de diferentes zonas agrícolas. Estas muestras tienen diferente contenido orgánico, especialmente los dos suelos de jardín; pero se puede considerar que todas ellas presentan un elevado contenido de materia orgánica y que, por lo tanto, son matrices complicadas.

Los analitos se adicionaron sobre estas muestras de suelo en concentraciones de 5 ng g^{-1} para los pesticidas organoclorados, teflutrina y transflutrina, y de 25 ng g^{-1} para los restantes compuestos. A continuación, las muestras fortificadas se analizaron siguiendo la metodología recomendada. Las respuestas obtenidas para algunos de los pesticidas estudiados se han representado en la Figura IV.1.9.

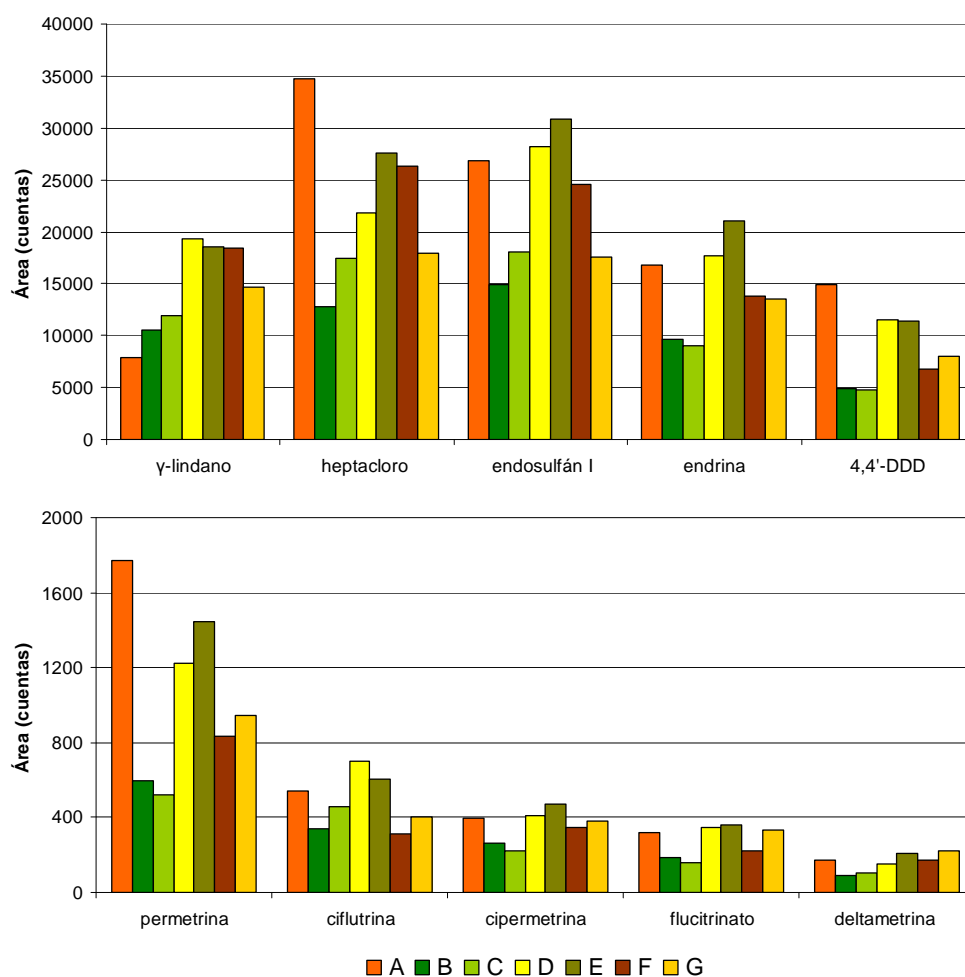


Figura IV.1.9 Influencia de la matriz en la extracción de algunos de los pesticidas objetivo en suelo.

De la Figura IV.1.9 se deduce que la matriz del suelo influye en la metodología propuesta; por lo tanto, para la cuantificación de las muestras de suelo se recurrió al **método de las adiciones estándar**.

En la Tabla IV.1.7 también se han incluido las **recuperaciones** estimadas para los pesticidas estudiados en la muestra E fortificada. En general, se obtuvieron buenas recuperaciones para la mayoría de los analitos (excepto para el fenitrothion), con valores comprendidos entre el 66% (aldrina) y el 128% (endosulfán II).

Finalmente, la exactitud del método también se evaluó mediante el análisis de un **material de referencia certificado** (RTC-CRM818-050). Los contenidos certificados para los pesticidas organoclorados así como las concentraciones estimadas y las correspondientes recuperaciones se han incluido en la Tabla IV.1.8. Las recuperaciones se calcularon hallando el cociente entre la cantidad de analito cuantificada mediante el método propuesto y el valor certificado. Además de los compuestos certificados, también se detectaron y cuantificaron dos productos de degradación de la endrina (aldehído de endrina y cetona de endrina). De los datos mostrados en la Tabla IV.1.8 se deduce que los valores estimados concuerdan con los certificados y que las recuperaciones son satisfactorias para todos los analitos.

Tabla IV.1.8 Validación del método: análisis de un material de referencia certificado (RTC-CRM818-050).

Pesticida	Valor certificado (ng g ⁻¹)	Valor estimado (ng g ⁻¹)	Recuperación (%)
α-Lindano	394	364	92
β-Lindano	333	363	109
γ-Lindano	416	391	94
Heptacloro	194	206	106
Aldrina	182	188	103
Endosulfán I	318	195	61
4,4'-DDE	417	521	125
Dieldrina	344	448	130
Endrina	340	324	95
4,4'-DDD	553	578	104
Endosulfán II	357	333	93
Aldehído de endrina		161	
4,4'-DDT	446	456	102
Sulfato de endosulfán	345	331	96
Metoxicloro	280	316	113
Cetona de endrina		175	

1.2.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUELO REALES

La metodología optimizada se aplicó a la determinación de los pesticidas investigados en 50 **muestras de suelo**. La gran mayoría de estas muestras se recogieron en 22 explotaciones ganaderas de diferentes puntos de la geografía gallega (suelos en parcelas de pradera, maíz o maíz/*ray-grass* italiano en rotación), aunque también se analizó alguna muestra de suelo de jardines urbanos.

A la vista de los resultados obtenidos, incluidos en la Tabla IV.1.9, todas las muestras evaluadas dieron positivo para alguno de los analitos estudiados. En algunas de las muestras los positivos se confirmaron por **GC-MS**. Así, se encontraron pesticidas **organoclorados** en el 98% de las muestras analizadas, siendo el γ -lindano (detectado en el 76% de los suelos) y el δ -lindano (78%) los más habituales. Por otro lado, se encontraron **piretroides** en un 32% de las muestras y el más frecuente fue la tetrametrina (16%). Finalmente, los **organofosforados** y las **cloroacetanilidas** se detectaron en un 92% y 50% de las muestras siendo los más comunes el clorpirifos (90%) y el alacloro (36%), respectivamente. Salvo en las muestras S₂ y AD en las que se detectó la dieldrina a un nivel de 14 y 19 ng g⁻¹, respectivamente, los restantes pesticidas se encontraron a niveles de concentración por debajo de los niveles establecidos por la legislación española (ver Tabla I.1.3 de la Introducción).

La Figura IV.1.10 ilustra el cromatograma de la muestra de suelo de jardín urbano J en la que se detectaron varios piretroides (ver concentraciones en la Tabla IV.1.9).

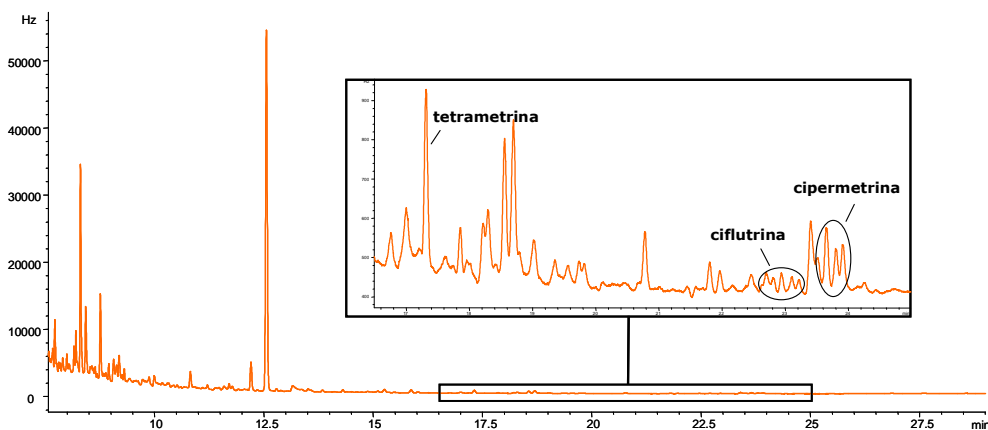


Figura IV.1.10 Cromatograma obtenido mediante HSPME-GC- μ ECD para la muestra J (suelo de jardín urbano) contaminada con varios piretroides.

Tabla IV.1.9 Concentraciones calculadas de los pesticidas identificados en las muestras de suelo reales (n.d. no detectado). Las muestras denotadas con la(s) misma(s) letra(s) pero con diferentes subíndices se refieren a muestras tomadas en la misma explotación, pero en diferentes parcelas. γ LI (γ -lindano), δ LI (δ -lindano), ACE (acetocloro), ALA (alacloro), HEP (heptacloro), FEN (fenitrotion), ALD (aldrina), CLO (clorpirifos), EPO (epóxido de heptacloro), DDE (4,4'-DDE), DIE (dieltrina), DDT (4,4'-DDD), DDT (4,4'-DDT), TET (tetrametrina), λ CI (λ -chlotrina), CIFE(cifenotrina), PER (permetrina), CIF (ciflutrina), CIP (cipermetrina).

muestra	Concentración calculada (ng g ⁻¹)															
	γ LI	δ LI	ACE	ALA	HEP	FEN	ALD	CLO	EPO	DDE	DIE	DDD	DDT	TET	λ CI	CIFE
H	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12	n.d.	2,2	n.d.	0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,1	n.d.	0,2	1,0	n.d.	n.d.	4,2
J	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52	n.d.	n.d.
K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,8	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	30	n.d.
L	n.d.	n.d.	37	58	n.d.	n.d.	n.d.	8,6	n.d.	4,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M ₁	2,3	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	14	0,1	14	n.d.	2,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M ₂	n.d.	5,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,1	8,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M ₃	2,3	1,0	36	41	3,6	n.d.	n.d.	6,8	n.d.	3,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N ₁	2,0	3,3	35	8,3	n.d.	12	<LOD	8,4	n.d.	3,0	n.d.	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N ₂	1,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
O ₁	n.d.	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	14	n.d.	7,6	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
O ₂	0,4	0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	5,3	n.d.	0,4	1,6	n.d.	n.d.	n.d.
O ₃	0,2	1,4	n.d.	4,9	n.d.	n.d.	n.d.	3,8	n.d.	8,0	n.d.	0,4	2,7	n.d.	n.d.	n.d.
P ₁	5,2	4,6	5,0	n.d.	n.d.	21	0,1	3,2	0,3	0,6	n.d.	n.d.	n.d.	43	n.d.	n.d.
P ₂	2,9	3,7	n.d.	6,4	n.d.	19	0,1	2,9	0,2	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	46	n.d.	n.d.
Q ₁	3,0	3,0	n.d.	7,3	n.d.	26	n.d.	3,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Q ₂	2,8	4,3	n.d.	n.d.	n.d.	14	0,1	1,8	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,5	n.d.	5,5
R ₁	3,6	3,7	n.d.	7,6	n.d.	19	0,1	2,6	n.d.	10	n.d.	0,8	3,0	n.d.	n.d.	n.d.
R ₂	2,4	n.d.	25	4,2	n.d.	n.d.	0,6	13	n.d.	7,6	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S ₁	0,2	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	4,7	n.d.	4,4	n.d.	0,3	1,8	23	n.d.	n.d.
S ₂	0,7	1,1	25	8,9	n.d.	n.d.	0,3	15	n.d.	3,7	14	n.d.	1,4	n.d.	n.d.	n.d.
T ₁	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,5	n.d.	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	88	n.d.	n.d.
T ₂	0,2	0,7	33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10	n.d.	20	n.d.	1,4	3,1	n.d.	n.d.	n.d.
T ₃	0,2	2,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	n.d.	10	n.d.	2,6	6,7	n.d.	n.d.	n.d.
U ₁	n.d.	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	33	0,1	0,9	n.d.	0,6	n.d.	1,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla IV.1.9 Concentraciones calculadas de los pesticidas identificados en las muestras de suelo reales (n.d. no detectado). Las muestras denotadas con la(s) misma(s) letra(s) pero con diferentes subíndices se refieren a muestras tomadas en la misma explotación, pero en diferentes parcelas. γ LI (γ -lindano), δ LI (δ -lindano), ACE (acetocloro), ALA (alacoloro), HEP (heptacoloro), FEN (fenitrotrona), ALD (aldrina), CLO (clorpirifos), EPO (epóxido de heptacoloro), DDE (4,4'-DDE), DIE (dieltrina), DDD (4,4'-DDD), DDT (4,4'-DDT), TET (tetrametrina), λ CI (λ -cihalotrina), CIFE (cifenotrina), PER (permetrina), CIF (ciflutrina), CIP (cipermetrina), (continuación).

muestra	Concentración calculada (ng g ⁻¹)														
	γ LI	δ LI	ACE	ALA	HEP	FEN	ALD	CLO	EPO	DDE	DIE	DDD	DDT	TET	λ CI
U ₂	0,3	2,1	n.d.	n.d.	n.d.	26	0,1	0,8	n.d.	5,3	n.d.	0,4	1,3	n.d.	n.d.
V ₁	4,1	6,0	n.d.	88	n.d.	n.d.	n.d.	9,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,2
V ₂	n.d.	3,3	5,4	54	n.d.	20	<LOD	15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
W	n.d.	2,1	n.d.	n.d.	n.d.	25	<LOD	0,4	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
X ₁	0,4	4,7	n.d.	n.d.	n.d.	20	0,1	8,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
X ₂	0,3	4,5	37	58	n.d.	20	0,1	8,6	n.d.	4,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Y ₁	3,8	2,9	n.d.	n.d.	n.d.	20	0,1	2,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Y ₂	1,5	2,6	n.d.	n.d.	n.d.	12	0,1	1,4	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Y ₃	2,6	4,6	n.d.	10	n.d.	18	0,1	4,4	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Z ₁	3,6	3,0	n.d.	1,9	n.d.	20	0,2	2,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Z ₂	2,8	n.d.	n.d.	35	n.d.	20	0,1	3,2	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AA ₁	n.d.	2,0	n.d.	n.d.	n.d.	29	<LOD	0,3	n.d.	1,8	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	3,3
AA ₂	n.d.	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,2
AB ₁	2,0	3,4	n.d.	n.d.	n.d.	13	0,1	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AB ₂	2,6	4,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AB ₃	3,4	1,9	n.d.	5,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AC ₁	8,0	3,9	n.d.	n.d.	n.d.	25	0,2	3,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AC ₂	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD	8,4	3,6	n.d.	60	n.d.	34	0,1	19	0,4	0,8	19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AE	2,1	2,8	27	n.d.	n.d.	18	0,1	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,9
AF ₁	5,1	5,8	37	n.d.	n.d.	43	0,2	6,2	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AF ₂	5,5	3,4	118	7,7	n.d.	42	0,1	13	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58	n.d.
AG ₁	3,8	4,1	4,6	n.d.	n.d.	17	0,1	3,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47	n.d.
AG ₂	1,4	n.d.	58	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	4,3	n.d.	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,6
AH	3,7	3,9	43	n.d.	n.d.	30	0,1	4,2	0,3	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo confirman que la técnica de **HSSPME acoplada a GC- μ ECD** resulta adecuada para la determinación de 36 pesticidas (la mayoría piretroides y organoclorados) en suelo. Además, el método desarrollado no requiere un tratamiento previo de la muestra, lo que supone una reducción drástica del tiempo de análisis y del consumo de disolvente orgánico. Finalmente, la metodología desarrollada se ha aplicado con éxito a diferentes muestras reales de horizonte superficial con alto contenido en materia orgánica en las que se han identificado y cuantificado algunos de los pesticidas incluidos en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Tao, S.; Liu, W.; Li, Y.; Yang, Y.; Zuo, Q.; Li, B.; Cao, J. Organochlorine pesticides contaminated surface soil as reemission source in the Haihe Plain, China. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 8395-8400.
- [2] Hilber, I.; Mader, P.; Schulin, R.; Wyss, G.S. Survey of organochlorine pesticides in horticultural soils and there grown Cucurbitaceae. *Chemosphere*, **2008**, 73, 954-961.
- [3] Rissato, S.R.; Galhiane, M.S.; Apon, B.M.; Arruda, M.S.P. Multiresidue analysis of pesticides in soil by supercritical fluid extraction/gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 62-69.
- [4] Arora, S.; Mukherjee, I.; Trivedi, T.P. Determination of pesticide residue in soil, water and grain from IPM and non-IPM field trials of rice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, 81, 373-376.
- [5] Esteve-Turrillas, F.A.; Aman, C.S.; Pastor, A.; de la Guardia, M. Microwave-assisted extraction of pyrethroid insecticides from soil. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 522, 73-78.
- [6] Hernández-Soriano, M.C.; Peña, A.; Mingorance, M.D. Response surface methodology for the microwave-assisted extraction of insecticides from soil samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 619-630.
- [7] Gonçalves, C.; Carvalho, J.J.; Azenha, M.A.; Alpendurada, M.F. Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central

- composite design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1110, 6-14.
- [8] Westbom, R.; Hussen, A.; Megersa, N.; Retta, N.; Mathiasson, L.; Björklund, E. Assessment of organochlorine pesticide pollution in Upper Awash Ethiopian state farm soils using selective pressurized liquid extraction. *Chemosphere* **2008**, 72, 1181-1187.
- [9] Dragan, D.; Cucu-Man, S.; Dirtu, A.C.; Mocanu, R.; Van Vaeck, L.; Covaci, A. Occurrence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soils and sediments from Eastern Romania. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2006**, 15, 833-842.
- [10] Gonçalves, C.; Alpendurada, M.F. Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, **2005**, 65, 1179-1189.
- [11] Ali, M.A.; Baugh, P.J. Pyrethroid soil extraction, properties of mixed solvents and time profiles using GC/MS-NICI analysis. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2003**, 83, 909-922.
- [12] Ozcan, S.; Tor, A.; Aydin, M.E. Application of miniaturised ultrasonic extraction to the analysis of organochlorine pesticides in soil. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 640, 52-57.
- [13] Ng, W.F.; Teo, M.J.K.; Lakso, H.-Å. Determination of organophosphorus pesticides in soil by headspace solid-phase microextraction. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 363, 673-679.
- [14] Zhao, R.; Wang, X.; Yuan, J.; Jiang, T.; Fu, S.; Xu, X. A novel headspace solid-phase microextraction method for the exact determination of organochlorine pesticides in environmental soil samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 1584-1589.
- [15] Doong, R.-A.; Liao, P.-L. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2001**, 918, 177-188.
- [16] Chai, X.; Jia, J.; Sun, T.; Wang, Y.; Liao, L. Application of a novel cold activated carbon fiber-solid phase microextraction for analysis of organochlorine pesticides in soil. *J. Environ. Sci. Health., Part B*, **2007**, 42, 629-634.
- [17] Wang, W.; Meng, B.; Lu, X.; Liu, Y.; Tao, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between

Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 602, 211-222.

- [18] Rodil, R.; Popp, P. Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorbenzenes in soils. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1124, 82-90.

CAPÍTULO IV.2. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN PIENSO

El uso generalizado de pesticidas para el control de plagas puede provocar la contaminación de productos utilizados para la **alimentación del ganado** lo que podría poner en riesgo la salud del animal o incluso la salud de las personas como consecuencia de la posible presencia de estos fitosanitarios en productos de origen animal, como por ejemplo la leche.

Los **componentes más comunes** en los piensos de ganado son el maíz, la cebada, la semilla de soja y el trigo. Sin embargo, los piensos contienen **sustancias adicionales** (especialmente grasas) lo que dificulta la extracción de los pesticidas de dichas muestras. Por lo tanto, el análisis de fitosanitarios en piensos es una **tarea complicada**, no sólo por los bajos niveles de detección exigidos por la legislación vigente (Tabla I.1.2 de la Introducción), si no también por la complejidad de la matriz.

El objetivo de este estudio es el desarrollo de metodologías de preparación de muestra para la **determinación de 36 fitosanitarios en pienso**. Inicialmente se planteó la posibilidad de utilizar la microextracción en fase sólida como base del procedimiento de extracción; sin embargo, después de probar distintas aproximaciones de esta técnica, se concluyó que los resultados obtenidos mediante SPME no eran satisfactorios. Así, finalmente, se recurrió a la **dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)** y a la **extracción con disolventes presurizados (PSE)**, utilizando en ambos casos como técnica de separación y detección el acoplamiento GC- μ ECD.

Para la extracción de pesticidas en pienso animal se han utilizado principalmente procedimientos basados en la extracción Soxhlet o con disolventes [1, 2]; se trata, en general, de metodologías tediosas y con una baja capacidad de procesamiento de muestra. Alternativamente, algunos autores han recurrido a técnicas de extracción más rápidas y automatizadas como son la USE, la extracción en lecho fluidizado (*fluidized-bed extraction*, FBE) o la MAE, para el análisis de pesticidas organoclorados en pienso para cerdos [3, 4]. El método QuEChERS también se ha adaptado al análisis simultáneo de varios pesticidas en cereales y en determinados alimentos para animales [5].

Hasta el momento, sólo se tiene conocimiento de un trabajo en el que se haya aplicado la MSPD al análisis de pesticidas en piensos, concretamente a la determinación de cuatro insecticidas organoclorados (entre otros compuestos clorados y bromados) en piensos de acuicultura [6]. Por otro lado, la información disponible en la bibliografía acerca de la aplicación de PSE a la extracción de fitosanitarios en piensos está limitada a dos trabajos en los que también se extrajeron únicamente pesticidas organoclorados [3, 7].

2.1 PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS

Se recogieron **muestras de pienso** de ganado en varias granjas de productos lácteos localizadas en Galicia. Estos piensos son muestras muy complejas preparadas a partir de la mezcla de varios productos (más de 10 en la mayoría de los casos) que contienen un elevado porcentaje de cereales, aceites vegetales, óxidos y sales. Las muestras se molieron y se tamizaron por un tamiz con luz de malla de 2 mm. Finalmente se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Para la **optimización** de los métodos propuestos, se empleó la muestra de pienso A fortificada al nivel de 100 ng g⁻¹ con los pesticidas investigados. Se prepararon 30 g y 60 g de muestra fortificada para el desarrollo de los métodos de MSPD y de PSE, respectivamente. En el primer caso, se pesaron 30 g de muestra en un vaso de precipitados grande y se añadieron 6 mL de una disolución de los pesticidas de 500 ng mL⁻¹ en acetona. A continuación se añadió un volumen extra de 15 mL de acetona con el objetivo de cubrir por completo la muestra con disolvente orgánico. La suspensión obtenida se mantuvo en una campana extractora (apagada) durante 36 h y a temperatura ambiente, agitándola ocasionalmente con una varilla de vidrio. Para los experimentos de PSE, se operó de forma equivalente, pero a los 60 g de muestra se añadieron 12 mL de la disolución de adición (500 ng mL⁻¹), mientras que el volumen extra de acetona fue de 30 mL. Análogamente, en ambos casos se prepararon blancos de la muestra de pienso añadiendo la misma proporción de acetona que a las muestras con adición. Finalmente, se tomaron fracciones de 0,5 y 1 g (MSPD) y de 1 y 3 g (PSE)

de las muestras fortificadas y de los blancos y se guardaron en el congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta 5-10 min antes de su análisis.

Para la **validación** de los métodos se utilizaron alícuotas de la muestra de pienso A fortificada a diferentes niveles de concentración comprendidos entre 5 y 100 ng g^{-1} . Además, para los estudios de recuperación se utilizaron otras muestras de pienso (B-I) con adición de 100 ng g^{-1} de los analitos.

Finalmente, para evaluar la **exactitud** del método se utilizó un **material de referencia certificado** (BCR-115) suministrado por la Oficina de Referencia de la Comunidad Económica Europea (*EC Community Bureau of Reference*, BCR). Se trata una mezcla preparada a base de ingredientes como trigo, maíz, soja, aceite, tapioca, y otros componentes, que pretende imitar un pienso para cerdos y aves de corral. Este material está certificado para el contenido de 10 pesticidas organoclorados: hexaclorobenceno ($19,4\pm 1,4\text{ ng g}^{-1}$), β -lindano ($23\pm 3\text{ ng g}^{-1}$), γ -lindano ($21,8\pm 1,9\text{ ng g}^{-1}$), heptacloro ($19,0\pm 1,5\text{ ng g}^{-1}$), γ -clordano ($48\pm 5\text{ ng g}^{-1}$), endosulfán I ($46\pm 4\text{ ng g}^{-1}$), dieldrina ($18\pm 3\text{ ng g}^{-1}$), endrina ($46\pm 6\text{ ng g}^{-1}$), o,p'-DDT ($46\pm 5\text{ ng g}^{-1}$) y p,p'-DDE ($47\pm 4\text{ ng g}^{-1}$).

2.1.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. MSPD

En todos los experimentos, previamente a la etapa de extracción, se añadieron a cada muestra $10\text{ }\mu\text{L}$ de una disolución de PCB-195 (empleado como surrogado) de $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ en isooctano.

En la Figura IV.2.1 se muestra un esquema del **procedimiento general** empleado para la extracción de pesticidas en muestras de pienso mediante MSPD.

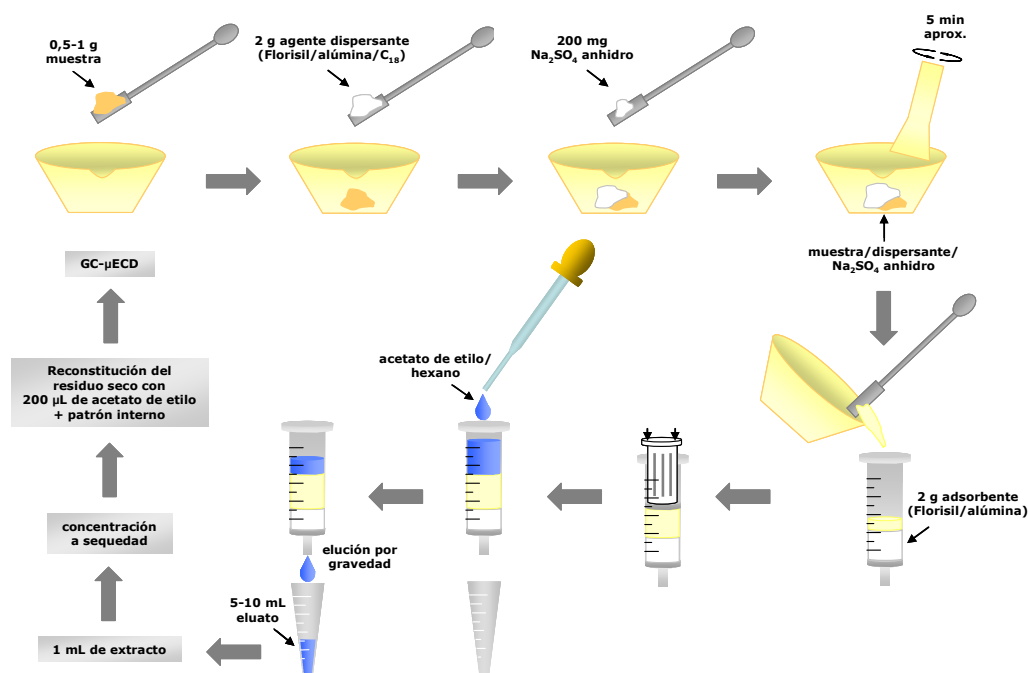


Figura IV.2.1 Esquema de extracción para la determinación de pesticidas en pienso mediante MSPD.

En primer lugar se mezclan, en un mortero de vidrio y con ayuda de un pistilo, 0,5 o 1 g de muestra de pienso con 2 g de agente dispersante (Florisil, alúmina o C₁₈) y con 200 mg de Na₂SO₄ anhidro durante aproximadamente 5 min, hasta conseguir una mezcla homogénea. A continuación la mezcla se transfiere a una columna con una frita de polipropileno en su parte inferior y en la que previamente se han introducido 2 g de adsorbente (co-columna de Florisil o alúmina). Se coloca una segunda frita encima de la mezcla y se comprime el contenido del cartucho de MSPD con el émbolo de una jeringa. Como disolvente de elución se utiliza hexano o acetato de etilo y se eluyen por gravedad un total de 5 o 10 mL de eluato en un tubo graduado. En los casos en los que se requiere la concentración del extracto, se toma 1 mL del mismo y se concentra a sequedad bajo corriente de N₂. Después, el residuo seco se reconstituye con 200 µL de acetato de etilo y se añade 1 µL de una disolución del PCB-166 (estándar interno) de 10 µg mL⁻¹ en isooctano. Finalmente, se inyecta 1 µL del extracto en el sistema cromatográfico.

2.1.3 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. PSE

Al igual que en las extracciones por MSPD, antes de la etapa de extracción, se añadieron a cada muestra 10 μL de una disolución de PCB-195 de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en isooctano.

Las extracciones se realizaron en un sistema **ASE 200** equipado con un carrusel para 24 muestras, celdas de acero inoxidable de 11 mL y viales colectores de 40 mL. En la Figura IV.2.2 se ilustra esquemáticamente el **procedimiento general** utilizado para la extracción de pesticidas en muestras de pienso mediante PSE.

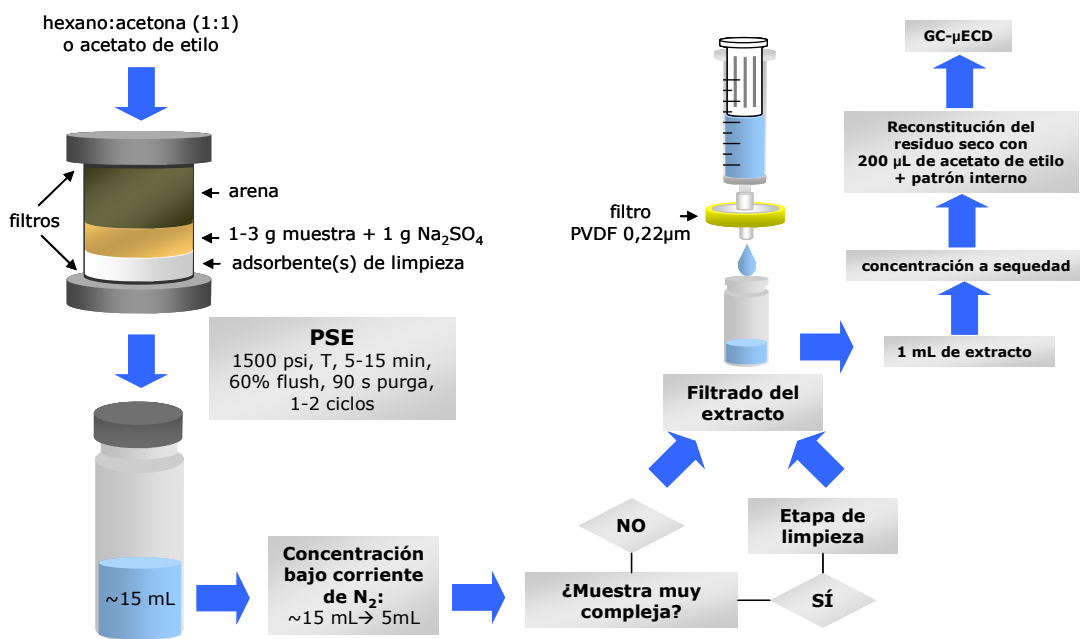


Figura IV.2.2 Esquema de extracción para la determinación de pesticidas en pienso mediante PSE.

En primer lugar, se colocan filtros en cada uno de los extremos de la celda. Posteriormente, en aquellos casos en los que se lleva a cabo una limpieza *in situ*, se introducen los adsorbentes correspondientes en la parte inferior de la celda, seguidos de la mezcla entre la muestra de pienso (1 o 3 g) y 1 g del agente de secado utilizado (Na_2SO_4 anhidro). A continuación, el volumen muerto de la celda se rellena con arena

lavada y, finalmente, la celda se cierra firmemente y se coloca en el carrusel del instrumento de PSE. Las extracciones se llevan a cabo precalentando la celda antes de llenarla con disolvente (modo *preheat*). La presión durante la extracción es de 1500 psi, mientras que el volumen del enjuague posterior a la extracción (*flush*) es de un 60%, y el tiempo de purga de 90 s. Como disolventes de elución se utilizan acetato de etilo o hexano:acetona (1:1, v/v), dependiendo del experimento. Las restantes variables (temperatura de extracción, tiempo de extracción, número de ciclos) también varían durante la optimización del método. El extracto obtenido, de aproximadamente 15 mL, se concentra a un volumen de 5 mL bajo corriente de N₂. En el caso de muestras muy complejas, en este punto se requiere una etapa de limpieza que se detallará más adelante (Apartado 2.3.5). A continuación los extractos se filtran a través de un filtro de jeringa de PVDF y con un tamaño de poro de 0,22 µm. Se toma 1 mL del eluato y se concentra a sequedad. Después el residuo seco se reconstituye con 200 µL de acetato de etilo y se añade 1 µL de una disolución del PCB-166 de 10 µg mL⁻¹ en isooctano. Finalmente, se inyecta 1 µL del extracto en el sistema cromatográfico.

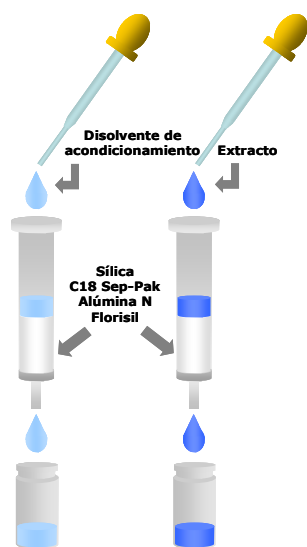


Figura IV.2.3 Limpieza de extractos mediante SPE clásica.

2.1.4 PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA BASADOS EN LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

Para la **limpieza de los extractos** obtenidos tanto en las extracciones por MSPD como por PSE, se investigaron diferentes procedimientos de limpieza basados en la extracción en fase sólida (SPE). Por una parte se probó la purificación mediante SPE clásica y, por otra, mediante SPE dispersiva (dSPE).

En lo que respecta a las **SPEs por el procedimiento clásico**, se evaluaron cuatro cartuchos diferentes: Sílica, C₁₈ Sep-Pak, Alúmina N y Florisil. En primer lugar, los cartuchos se acondicionaron con aproximadamente 5 mL de disolvente orgánico. A continuación el extracto (5 mL) se añadió al cartucho y se eluyó por gravedad (Figura IV.2.3).

En cuanto a las limpiezas por **dSPE**, se pesaron 500 mg de adsorbente (alúmina, Florisil, una mezcla de ambos, PSA o sílica) y se mezclaron con el extracto (5 mL). La mezcla se agitó durante 2 min en un vórtex y después se filtró a través de un filtro de jeringa de PVDF y con un tamaño de poro de 0,22 μm . Para la purificación de los extractos obtenidos mediante MSPD también se probó la SPE dispersiva utilizando virutas de cobre en lugar de los adsorbentes señalados anteriormente. Las virutas de cobre están especialmente indicadas para la eliminación de posibles interferencias de azufre elemental.

2.1.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES

La mayoría de los análisis se realizaron en un **cromatógrafo de gases** Hewlett-Packard modelo 6890, acoplado a un detector **^{63}Ni de microcaptura electrónica** (μECD) y equipado con un inyector split/splitless. Para el control del equipo y la adquisición y tratamiento de los datos se utilizó el programa informático GC Chemstation.

Las **condiciones instrumentales** utilizadas se resumen en la Tabla IV.2.1. En el presente estudio se han investigado los mismos pesticidas que en el Capítulo IV.1, sin embargo, en este caso hay que tener en cuenta la presencia de dos compuestos adicionales: PCB-166 (estándar interno) y PCB-195 (surrogado). Utilizando las condiciones indicadas en la Tabla IV.1.2 (Capítulo IV.1) no se logró la completa separación de los pesticidas y de los 2 PCBs, de tal manera que se tuvo que recurrir a un programa de temperaturas diferente. Además, a lo largo de las pruebas realizadas durante esta investigación no siempre se utilizó la misma columna cromatográfica, si bien es cierto que la mayoría de los análisis se llevaron a cabo utilizando la columna HP-5MS.

Tabla IV.2.1 Condiciones instrumentales empleadas en el GC- μ ECD para la determinación en pienso de los pesticidas investigados.

GC-μECD	
INYECTOR	Split/splitless
Temperatura	280 °C
Modo de inyección	splitless
Tiempo de purga	2 min
COLUMNA 1	HP-5MS
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m
COLUMNA 2	VF-5MS
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
COLUMNA 3	VF-5MS
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	50 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
PROGRAMA DE TEMPERATURAS	
Temperatura inicial	80 °C (2 min)
Rampa de temperatura 1	15 °C min ⁻¹ hasta 200 °C
Rampa de temperatura 2	3 °C min ⁻¹ hasta 235 °C (1 min)
Rampa de temperatura 3	20 °C min ⁻¹ hasta 300 °C (10 min)
Tiempo total de análisis	35,92 min
GAS PORTADOR	He
Presión en cabeza de columna	6,07 psi
Flujo en columna	1 mL min ⁻¹ (constante)
DETECTOR	
Temperatura	300 °C
Gas auxiliar	N ₂
Flujo de gas auxiliar	30 mL min ⁻¹

Además, para confirmar resultados positivos, algunas muestras reales se analizaron por **GC-MS**. En estos análisis se utilizó un **cromatógrafo de gases** Varian 3800 equipado con un inyector split/splitless Varian 1079 y provisto de un detector de **espectrometría de masas de trampa de iones** Varian Saturn 2000. Para el control del equipo y la adquisición y procesamiento de los datos se utilizó el programa Saturn GC/MS Workstation v5.4. La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico (EI)

positivo (+70 eV). Se trabajó en modo *full scan* en el rango de masas 80-500 m/z, con una velocidad de barrido de 0,6 s scan⁻¹.

2.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: MSPD

2.2.1 EXPERIMENTOS PREVIOS DE MSPD

La eficacia de las extracciones por MSPD depende de la cantidad de muestra, del tipo y cantidad del agente dispersante, y de la naturaleza y volumen del disolvente de elución. Tal y como se mencionó en el **Apartado 2.1.2**, se recurrió a una limpieza *in situ* mediante la introducción de un adsorbente (co-columna) en la parte inferior de la columna de MSPD; de tal manera que tanto la naturaleza como la cantidad de adsorbente fueron otros factores adicionales a tener en cuenta en la optimización del método. La relación muestra:agente dispersante más habitual es 1:4, mezclando **2 g de agente dispersante** con **0,5 g de muestra**; por lo tanto, estas fueron las cantidades manejadas inicialmente. Por otro lado, se comprobó que trabajando con **2 g de adsorbente** (co-columna) se obtienen extractos lo suficientemente limpios como para someterlos al análisis cromatográfico directo.

La naturaleza del **disolvente de elución** fue otro aspecto importante a tener en cuenta ya que se buscaba conseguir, simultáneamente, la desorción eficiente de los analitos y la retención de los componentes de la matriz en la columna de MSPD. Se realizaron una serie de pruebas preliminares para evaluar dos disolventes: hexano (apolar) y acetato de etilo (polar). En estos experimentos se recogió un volumen final de 10 mL de eluato. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el hexano no es un disolvente adecuado ya que la mayoría de los

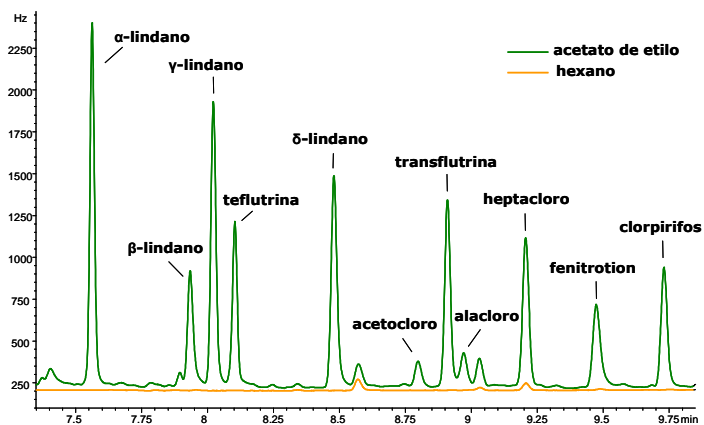


Figura IV.2.4 Comparación de los resultados obtenidos utilizando hexano y acetato de etilo como disolventes de elución, (columna VF-5MS de 30m).

pesticidas estudiados no se recuperaron eficazmente; mientras que con acetato de etilo sí se consiguió una elución selectiva de los analitos. Se demostró por tanto que el **acetato de etilo** es un disolvente apropiado por lo que se empleó en todos los experimentos posteriores. En la Figura IV.2.4 se muestra una parte de los cromatogramas obtenidos en estas pruebas utilizando uno y otro disolvente.

2.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MSPD: DISEÑO FACTORIAL

Con el objetivo de reducir el tiempo necesario para conseguir las condiciones óptimas de extracción, se planteó un **diseño experimental** para investigar el efecto de las restantes variables: naturaleza del agente dispersante (A), naturaleza del adsorbente de limpieza (B), y volumen del disolvente de elución (C). El dominio experimental seleccionado se muestra en la Tabla IV.2.2.

Tabla IV.2.2 Factores y niveles considerados en el diseño experimental.

Factor	Código	Nivel bajo (-)	Nivel central	Nivel alto (+)	Continuo
Agente dispersante	A	C ₁₈	Florisil	alúmina	No
Adsorbente	B	alúmina		Florisil	No
Volumen de elución (mL)	C	5		10	Sí

Sobre la base de la bibliografía consultada acerca de la extracción por MSPD de pesticidas en muestras vegetales y alimentarias [8-12], el agente dispersante se evaluó a tres niveles, C₁₈, alúmina y Florisil; mientras que se probaron dos adsorbentes de limpieza: alúmina y Florisil. En lo que respecta al volumen de elución, se estudió a dos niveles, 5 y 10 mL.

Se propuso un **diseño multi-factorial categórico (3x2x2)** dado que se pretendía evaluar varios factores no cuantitativos. Este diseño es factorial estándar, ya que consiste en todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores, por lo que se ejecutaron un total de **12 experiencias**. Tiene **resolución V**, lo que quiere decir que se pueden evaluar los efectos principales, así como las interacciones entre dos factores de las variables investigadas. En cada experimento, se mezclaron 0,5 g de la muestra de pienso A fortificada (100 ng g⁻¹) junto con 2 g de agente dispersante y 200

mg de Na_2SO_4 ; una vez que se completó la dispersión de la muestra se empaquetó en una columna de MSPD en la que ya se habían introducido previamente 2 g de adsorbente; finalmente, los analitos se eluyeron por gravedad con acetato de etilo. Las restantes condiciones correspondientes a cada una de las experiencias del diseño están especificadas en la **matriz de experimentos** generada por el programa Statgraphics XV Centurion (Tabla IV.2.3).

Tabla IV.2.3 Matriz de experiencias del diseño multi-factorial categórico (3x2x2).

Experiencia	Agente dispersante	Adsorbente	Volumen de elución (mL)
1	C ₁₈	alúmina	5
2	C ₁₈	alúmina	10
3	C ₁₈	Florisil	5
4	C ₁₈	Florisil	10
5	Florisil	alúmina	5
6	Florisil	alúmina	10
7	Florisil	Florisil	5
8	Florisil	Florisil	10
9	alúmina	alúmina	5
10	alúmina	alúmina	10
11	alúmina	Florisil	5
12	alúmina	Florisil	10

En un análisis de varianza (**ANOVA**) se distribuye la variabilidad de la respuesta obtenida para cada compuesto estudiado entre cada uno de los factores. La contribución de cada factor se mide teniendo en cuenta el efecto de los demás factores, y la significación estadística de cada uno de ellos se comprueba comparando la media cuadrática frente al error experimental estimado. En una tabla de ANOVA se recogen, entre otros parámetros, los valores de la **proporción F (F-ratio) y el valor p** para esta proporción. La proporción F mide la contribución de cada factor o interacción en la varianza de la respuesta. Por su parte, el valor de p evalúa la significación estadística de cada factor o interacción. Así, para un nivel de confianza del 90%, un valor de **p<0,10** implica que dicho factor o interacción es estadísticamente significativo. En la Tabla IV.2.4 se resumen los valores de F y de p para los compuestos estudiados. En esta tabla se han incluido los valores tanto para los factores como para las interacciones entre factores.

Tabla IV.2.4 Valores de F y p obtenidos mediante ANOVA para los 3 factores y sus correspondientes interacciones (en negrita se han resaltado los efectos significativos para un nivel de confianza del 90%).

Pesticida	Factores						Interacciones					
	A		B		C		AB		AC		BC	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
α -Lindano	1,90	0,35	15,3	0,06	1,76	0,32	0,29	0,77	0,42	0,70	0,09	0,80
β -Lindano	3,70	0,21	1,62	0,33	0,65	0,53	0,03	0,97	0,04	0,96	0,12	0,76
γ -Lindano	8,85	0,10	1,97	0,30	0,05	0,84	0,35	0,74	0,02	0,98	0,95	0,43
Teflutrina	7,20	0,12	0,68	0,50	0,00	0,95	0,03	0,97	0,10	0,91	0,91	0,44
δ -Lindano	2,67	0,27	10,6	0,08	1,08	0,41	0,27	0,79	0,25	0,80	0,69	0,49
Acetocloro	0,26	0,79	2,22	0,27	3,96	0,18	0,39	0,72	0,07	0,94	0,30	0,64
Transflutrina	0,23	0,82	2,97	0,23	0,02	0,91	0,06	0,94	0,14	0,88	0,00	0,99
Alacloro	1,29	0,44	17,0	0,05	0,50	0,55	1,59	0,39	0,64	0,61	0,00	0,98
Heptacloro	4,78	0,17	0,24	0,68	0,28	0,65	0,04	0,96	0,02	0,98	0,06	0,83
Fenitrotion	0,04	0,96	0,03	0,87	0,05	0,84	0,11	0,90	0,11	0,90	0,24	0,67
Aldrina	1,59	0,39	1,09	0,41	1,80	0,31	0,85	0,54	1,67	0,37	1,00	0,42
Clorpirifos	0,92	0,52	17,4	0,05	5,49	0,14	0,40	0,71	0,39	0,72	0,12	0,76
Epóxido de heptacloro	2,40	0,29	5,78	0,14	0,20	0,70	0,28	0,78	0,13	0,89	0,01	0,92
Aletrina	0,88	0,53	4,46	0,17	4,46	0,17	1,26	0,44	0,36	0,73	0,21	0,69
γ -Clordano	0,79	0,56	2,27	0,27	0,02	0,89	0,32	0,76	0,18	0,85	0,09	0,79
4,4'-DDE	4,23	0,19	2,31	0,27	0,42	0,58	0,05	0,95	0,23	0,81	0,01	0,92
Dieldrina	5,74	0,15	3,64	0,20	0,45	0,57	0,20	0,83	0,33	0,75	0,11	0,77
Endrina	0,68	0,60	1,81	0,31	0,00	0,97	0,05	0,95	0,05	0,95	0,11	0,78
Endosulfán II	2,00	0,33	1,35	0,36	0,00	0,98	0,38	0,73	0,32	0,76	0,08	0,81
4,4'-DDD	1,19	0,46	8,65	0,10	0,77	0,47	0,46	0,69	0,31	0,77	0,09	0,80
Aldehído de endrina	0,72	0,58	352	0,00	275	0,04	1,89	0,35	3,82	0,21	183	0,01
Sulfato de endosulfán	4,02	0,20	20,9	0,04	0,18	0,71	0,45	0,69	0,29	0,77	0,71	0,49
4,4'-DDT	0,39	0,72	6,28	0,13	0,23	0,68	0,11	0,90	0,00	1,00	0,43	0,58
Cetona de endrina	0,72	0,58	8,40	0,10	0,00	0,95	0,10	0,91	0,20	0,83	0,06	0,83
Tetrametrina	9,34	0,10	0,01	0,92	2,93	0,23	0,42	0,71	1,80	0,36	0,65	0,50
Metoxicloro	0,39	0,72	1,41	0,36	0,18	0,71	0,03	0,97	0,04	0,96	0,30	0,64
λ -Cihalotrina	0,66	0,60	0,87	0,45	1,28	0,38	0,16	0,86	0,30	0,77	2,85	0,23
Cifenotrina	0,14	0,88	2,52	0,25	4,03	0,18	0,89	0,53	0,23	0,81	1,48	0,35
Permetrina	1,87	0,35	0,10	0,79	11,5	0,08	0,04	0,97	0,48	0,67	0,03	0,88
Ciflutrina	2,01	0,33	33,4	0,03	1,56	0,34	7,30	0,12	0,74	0,58	0,24	0,67
Cipermetrina	0,15	0,87	2,79	0,24	0,52	0,55	0,20	0,83	0,07	0,94	0,02	0,91
Fenvalerato	2,47	0,29	10,1	0,09	3,73	0,19	0,22	0,82	0,13	0,88	0,05	0,84
Deltametrina	0,86	0,54	120	0,01	4,13	0,18	39,3	0,02	0,67	0,60	5,16	0,15

De los resultados mostrados en la tabla se puede concluir que el **tipo de adsorbente** (B) fue la variable que más afectó a la eficacia de la extracción, siendo significativa para varios pesticidas (α -lindano, δ -lindano, alacloro, clorpirifos, aldehído de endrina, sulfato de endosulfán, ciflutrina, fenvalerato y deltametrina) y estando en el límite de significación para el 4,4'-DDD y la cetona de endrina ($p=0,10$). Por otro lado, el **agente dispersante** (A) no fue un factor significativo para ninguno de los pesticidas estudiados, mientras que el **volumen de elución** (C) fue sólo significativo para el aldehído de endrina y la permetrina. En lo que respecta a las **interacciones** entre

factores, las interacciones **adsorbente-volumen de elución** (BC) y **agente dispersante-adsorbente** (AB) sólo fueron significativas para el aldehído de endrina y la deltametrina, respectivamente.

Los resultados de un análisis de varianza también se pueden representar gráficamente mediante **gráficos ANOVA** cuya escala es tal que, si un factor no tiene un efecto significativo, la variación observada para el mismo debería ser comparable a la de los residuales. A modo de ejemplo, en la Figura IV.2.5 se muestra el gráfico ANOVA para el sulfato de endosulfán. Tal y como se deduce de este gráfico, el factor B (adsorbente) conduce a variaciones en la respuesta que no se pueden atribuir al error experimental, de hecho $p=0,04$.

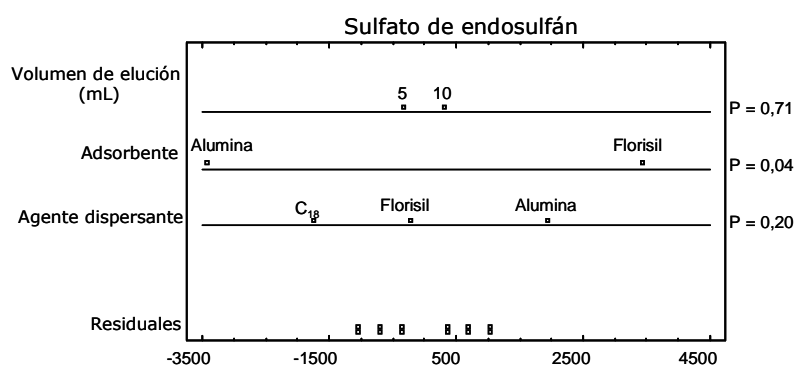


Figura IV.2.5 Gráfico de ANOVA para el sulfato de endosulfán.

Las **gráficas de medias** son gráficos útiles a la hora de ilustrar el efecto de las variables, puesto que muestran los valores medios así como los intervalos de confianza para cada nivel. Estas gráficas se emplearon para identificar qué nivel de cada factor conducía a las mayores respuestas para cada analito en particular. En general, la mayoría de los pesticidas estudiados mostraron un comportamiento similar en lo que respecta a las condiciones de extracción más adecuadas. En la Figura IV.2.6 se han incluido las gráficas de medias para algunos compuestos representativos.

Analizando los gráficos de medias para el **agente dispersante**, se observó que la alúmina era el dispersante más favorable para la mayoría de los compuestos estudiados (ver Figura IV.2.6 (a) para el δ -lindano y la transflutrina) aunque, en general, se obtuvieron respuestas equivalentes independientemente de la naturaleza

de dicha fase sólida. Sin embargo se observó que el uso de C_{18} conducía a un incremento de los artefactos cromatográficos y de la línea base si se comparaba con los cromatogramas obtenidos con Florisil y alúmina; además, este dispersante condujo a recuperaciones anormalmente altas (próximas o incluso superiores al 200%) para algunos pesticidas como la aldrina. Silveira Dórea y Lanças [9] observaron comportamientos similares tras emplear C_{18} como dispersante para la extracción mediante MSPD de piretroides y organofosforados en anacardos y frutas de la pasión.

Con respecto al **tipo de adsorbente**, el Florisil condujo a las mejores recuperaciones para todos los analitos (ver algunos ejemplos en la Figura IV.2.6 (b)). En cuanto al **volumen de elución**, en general, cuando se recogieron 10 mL de extracto en lugar de 5 mL no se observaron diferencias o sólo un ligero incremento en la señal cromatográfica (ver Figura IV.2.6 (c)) aunque, tal y como se mencionó anteriormente, este incremento de la respuesta sólo fue significativo para el aldehído de endrina y la permetrina.

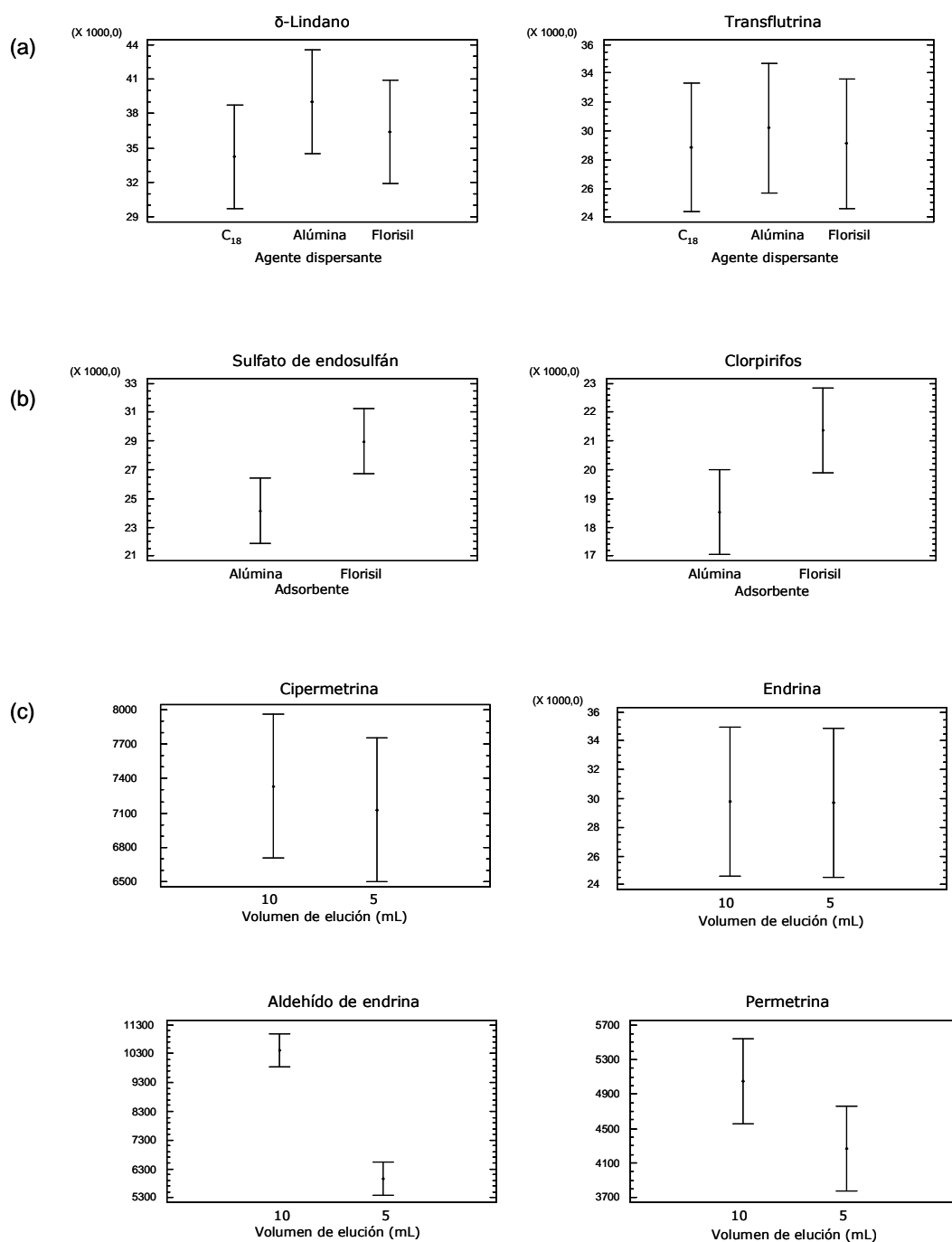


Figura IV.2.6 Gráficos de medias para los efectos principales estudiados en el diseño multi-factorial categórico: (a) agente dispersante; (b) adsorbente; (c) volumen de elución.

Ya se dedujo de la Tabla IV.2.4 que sólo dos interacciones fueron significativas y, a modo de ejemplo, en la Figura IV.2.7 se muestra el gráfico de la **interacción BC** para el aldehído de endrina. Este gráfico muestra la respuesta media a cada combinación de adsorbente (B) y volumen de elución (C). De esta Figura IV.2.7 se extrae que al usar alúmina se produce un incremento significativo de la respuesta al eluir 10 mL, mientras que si se usa Florisil como adsorbente la elución de 10 mL conduce a resultados similares que eluyendo 5 mL.

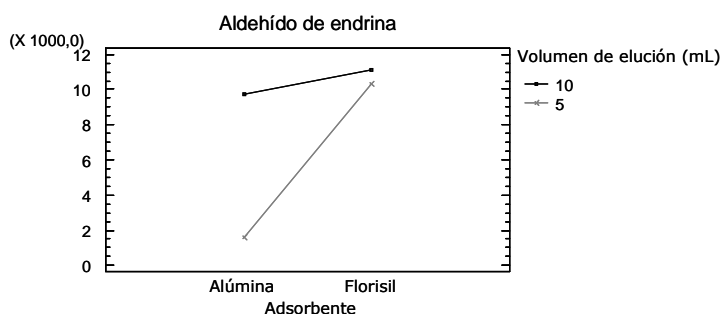


Figura IV.2.7 Interacción entre el tipo de adsorbente y el volumen de elución (BC) para el aldehído de endrina.

A pesar de que, en general, no se detectaron efectos de interacción entre los factores estudiados, los gráficos correspondientes fueron muy útiles a la hora de visualizar las **condiciones de extracción más favorables**. La Figura IV.2.8 incluye algunos ejemplos que muestran comportamientos generales. Así, el **gráfico de interacción AB** (agente dispersante-adsorbente) muestra que usando alúmina como dispersante se consiguen extracciones más eficientes, siendo Florisil el adsorbente más adecuado para la obtención de señales cromatográficas más elevadas (Figura IV.2.8 (a)). En relación al agente dispersante, se llega a la misma conclusión observando los **gráficos de interacción AC** (agente dispersante-volumen de elución) a partir de los cuales también se confirma que eluir 10 mL en lugar de 5 mL no modifica las respuestas obtenidas (Figura IV.2.8 (b)). Finalmente, el **gráfico de interacción BC** (adsorbente-volumen de elución) muestra de nuevo que el Florisil es el adsorbente de limpieza más adecuado, mientras que un volumen de elución de 10 mL no conduce a una mejoría importante en las recuperaciones (Figura IV.2.8 (c)). En este sentido, es importante subrayar que la elución con 5 mL no sólo conduce a extractos menos diluidos, si no

que también reduce el consumo de disolvente orgánico y la coelución de interferencias potenciales, así como el tiempo de análisis.

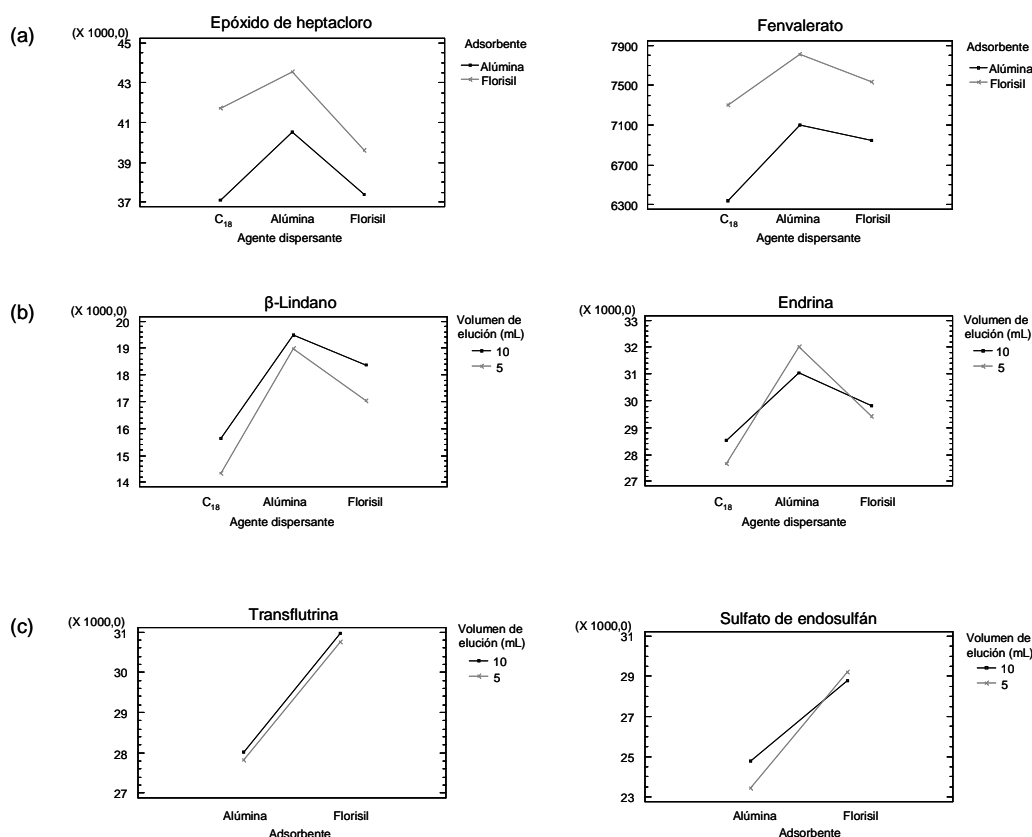


Figura IV.2.8 Gráficos de interacción para algunos compuestos representativos: (a) agente dispersante-adsorbente; (b) agente dispersante-volumen de elución; (c) adsorbente-volumen de elución.

Después de la optimización de las variables consideradas, se recomendó un **procedimiento definitivo** para la extracción simultánea de los 36 pesticidas investigados en pienso mediante MSPD. En la Tabla IV.2.5 se recogen los niveles propuestos para cada uno de los factores evaluados mediante el diseño experimental, así como las variables que se han considerado fijas para estos experimentos.

Tabla IV.2.5 Niveles óptimos de los factores estudiados y variables fijas.

Factores estudiados	Óptimo
Agente dispersante	alúmina
Adsorbente	Florisil
Volumen de elución (mL)	5
Factores fijos	
Tamaño de muestra (g)	0,5
Cantidad de dispersante (g)	2
Cantidad de adsorbente (g)	2
Na ₂ SO ₄ anhidro (mg)	200
Disolvente	Acetato de etilo

2.2.3 INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Se llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo de comprobar la validez del método MSPD desarrollado al incrementar el tamaño de muestra de **0,5 g a 1 g**. Para ello, se extrajo 1 g de muestra de pienso A con adición (100 ng g^{-1}) utilizando las condiciones recomendadas

(Tabla IV.2.5) y los resultados se compararon con aquéllos

obtenidos al extraer 0,5 g de muestra. Se observó que las respuestas de los pesticidas investigados se duplicaban y que no se detectaba un empeoramiento notable en el fondo cromatográfico. Por tanto, a fin de mejorar la sensibilidad del método, en los siguientes experimentos se manejó un **tamaño de muestra de 1 g**.

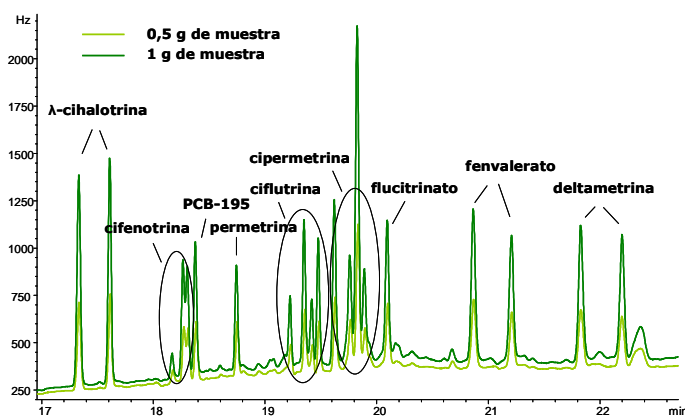


Figura IV.2.9 Influencia del tamaño de muestra (0,5-1 g) en la MSPD de una muestra de pienso fortificada con 100 ng g^{-1} de los pesticidas investigados, (columna VF-5MS de 30 m).

A modo de ejemplo, en la Figura IV.2.9 se muestra la comparativa de los cromatogramas obtenidos con ambos tamaños de muestra. Concretamente se muestra la parte de los cromatogramas en la que eluyen los piretroides menos volátiles.

2.2.4 PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los eluatos obtenidos utilizando las condiciones de MSPD seleccionadas fueron lo suficientemente limpios como para poder ser analizados directamente en el GC- μ ECD. Sin embargo, en los correspondientes cromatogramas se observaron algunos picos atribuidos a componentes de la matriz que dan señal en el μ ECD. Aunque la mayoría de estos picos no comprometieron la detección y cuantificación de los analitos, se probaron algunos **protocolos para la limpieza de estos extractos**.

En primer lugar, se examinaron procedimientos de **extracción en fase sólida (SPE) clásica** empleando cartuchos de Alumina N, Florisil, Sílica y C₁₈ Sep-Pak previamente acondicionados con acetato de etilo. También se evaluó la limpieza de los extractos mediante **SPE dispersiva** utilizando alúmina, Florisil, sílica o virutas de cobre, tal y como se ha explicado en el **Apartado 2.1.4**.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las recuperaciones y tampoco se apreció una mejoría significativa en los perfiles cromatográficos por medio de ninguno de estos procedimientos de limpieza. Tan solo en el caso de la dSPE con alúmina se notó una leve mejoría en la resolución cromatográfica para la permetrina y la deltametrina. Se concluyó por tanto que no merecía la pena incluir una etapa extra para la limpieza a posteriori de los extractos de MSPD.

2.2.5 CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Con el propósito de mejorar la sensibilidad del método se probaron dos estrategias diferentes para la **concentración de los extractos**. Por un lado, se tomaron alícuotas de 1 mL de los extractos de MSPD y se concentraron a sequedad bajo corriente de nitrógeno para, posteriormente, re-disolver los residuos secos con 200 μ L de acetato de etilo. Además, se realizaron varias pruebas en las que las alícuotas de 1 mL se concentraron directamente a 200 μ L. Se observó que las respuestas obtenidas en

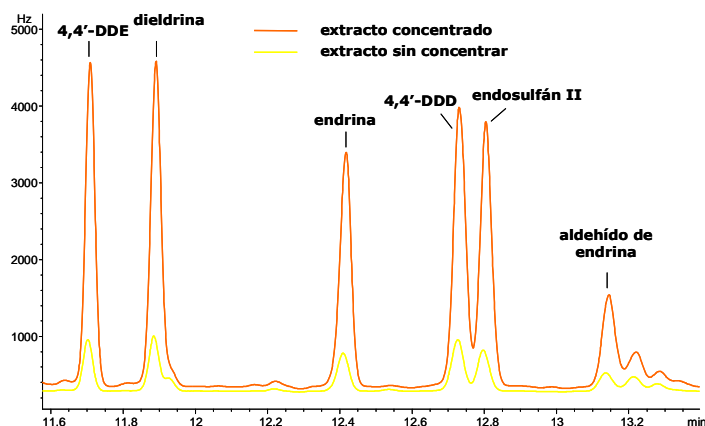


Figura IV.2.10 Superposición de los cromatogramas obtenidos para un extracto (concentrado y sin concentrar) de MSPD de 1 g de pienso con adición de 20 ng g⁻¹.

ambos experimentos eran equivalentes, con coeficientes de variación (RSD, %) alrededor del 5% para la mayoría de los analitos, y cinco veces mayores que las obtenidas para los extractos sin concentrar (ver Figura IV.2.10 para algunos de los pesticidas). De esta manera se demostró que durante la evaporación del

disolvente no se producen pérdidas de los pesticidas estudiados por volatilización de los mismos. Por tanto, de aquí en adelante se recurrió a la concentración de extractos para mejorar la sensibilidad del procedimiento desarrollado.

2.2.6 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO

Se estimaron los **parámetros de calidad del método** con el objetivo de verificar que el método MSPD-GC-μECD desarrollado es adecuado para la determinación cuantitativa de los pesticidas investigados en pienso de ganado (Tabla IV.2.6).

La **linealidad instrumental** se evaluó en el rango de concentraciones comprendido entre 1 y 100 ng mL⁻¹ utilizando disoluciones estándar preparadas en acetato de etilo. Se consideraron un total de seis niveles de concentración y cada uno de ellos se inyectó por triplicado. Con los resultados obtenidos se demostró la linealidad de la respuesta, obteniéndose coeficientes de correlación (R) por encima de 0,990 para todos los analitos.

Para la estimación de la precisión y de los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método, se analizaron muestras de pienso fortificadas con concentraciones conocidas de los pesticidas estudiados.

La **precisión** del método se evaluó en un mismo día (**repetibilidad**) y entre varios días (**reproducibilidad**) a dos niveles de concentración (20 y 100 ng g⁻¹). Los resultados obtenidos se expresaron en términos de la desviación estándar relativa (RSD, %) y se han incluido en la Tabla IV.2.6. En lo que respecta a la repetibilidad del método, los resultados obtenidos están comprendidos entre el 0,2% y el 16%, con un valor medio de 3,3%; mientras que para la variabilidad entre días la media fue de 5,8%, con valores comprendidos entre el 1,2% y el 14%.

Tabla IV.2.6 Precisión, linealidad y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método propuesto.

Pesticida	Linealidad R	Precisión (RSD, %)				LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
		Repetibilidad		Reproducibilidad			
		20 ng/g (n=3)	100 ng/g (n=4)	20 ng/g (n=2 d)	100 ng/g (n=3 d)		
α-Lindano	0,9978	1,9	3,7	4,2	4,0	0,03	0,10
β-Lindano	0,9976	1,5	2,7	5,4	3,5	0,11	0,38
γ-Lindano	0,9976	1,5	3,5	4,7	3,9	0,08	0,25
Teflutrina	0,9976	0,9	3,0	3,5	4,1	0,08	0,28
δ-Lindano	0,9961	1,9	3,3	2,7	3,9	0,08	0,26
Acetocloro	0,9996	7,3	2,3	5,0	3,3	1,20	4,00
Transflutrina	0,9979	3,7	2,8	3,7	4,8	0,08	0,26
Alacloro	0,9995	1,0	1,1	3,6	1,4	1,50	5,00
Heptacloro	0,9962	0,9	2,0	5,5	3,4	0,08	0,28
Fenitroton	0,9986	0,6	2,3	2,0	3,6	0,06	0,21
Aldrina	0,9981	2,5	3,6	3,0	4,6	0,08	0,26
Clorpirifos	0,9993	1,0	2,3	1,2	4,6	0,11	0,38
Epóxido de heptacloro	0,9986	1,9	3,3	3,4	4,2	0,06	0,20
Aletrina	0,9982	3,6	2,1	3,7	3,4	0,30	1,00
γ-Clordano	0,9984	3,1	3,3	3,6	4,5	0,05	0,18
Endosulfán I	0,9986	1,6	1,9	7,3	10	0,09	0,30
α-Clordano	0,9984	2,6	6,1	4,5	7,5	0,10	0,32
4,4'-DDE	0,9967	2,2	3,9	4,3	4,8	0,10	0,32
Dieldrina	0,9986	3,8	4,5	4,0	4,6	0,09	0,30
Endrina	0,9970	7,3	5,0	4,4	5,4	0,06	0,20
Endosulfán II	0,9982	7,1	3,6	8,1	5,0	0,05	0,18
4,4'-DDD	0,9978	2,6	3,0	5,1	5,6	0,05	0,18
Aldehído de endrina	0,9985	7,3	4,5	8,6	11	0,12	0,40
Sulfato de endosulfán	0,9978	1,6	2,2	4,0	3,2	0,09	0,30
4,4'-DDT	0,9925	6,7	5,1	14	11	0,30	1,00
Cetona de endrina	0,9969	2,0	3,7	7,3	4,8	0,12	0,40
Tetrametrina	0,9992	3,9	16	9,0	14	0,75	2,50
Metoxicloro	0,9962	5,6	5,1	13	11	1,05	3,50
λ-Cihalotrina	0,9969	0,8	3,0	10	5,2	0,21	0,70
Cifenotrina	0,9943	1,9	1,5	7,3	3,4	0,42	1,40
Permetrina	0,9974	0,3	3,2	13	5,5	0,36	1,20
Ciflutrina	0,9901	0,2	3,2	1,9	5,3	0,90	3,00
Cipermetrina	0,9927	9,4	3,4	13	2,7	0,54	1,80
Flucitrinato	0,9914	4,5	2,9	4,1	5,7	0,90	3,00
Fenvalerato	0,9916	3,4	2,0	5,2	6,7	0,90	3,00
Deltametrina	0,9963	3,3	1,6	14	8,9	1,50	5,00

De nuevo, los **LODs y LOQs** del método se calcularon como la concentración a la que le corresponde una relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente. Para estimar estos límites se empleó el extracto de MSPD obtenido para la muestra de pienso A con adición de 5 ng g^{-1} de los analitos. Tanto los LODs como los LOQs son del orden del bajo ng g^{-1} o inferiores al ng g^{-1} , y ambos están además por debajo de los MRLs establecidos para los residuos de pesticidas en pienso animal, maíz, trigo, semilla de soja y cebada (ver Tabla I.1.2 de la Introducción). Además, estos límites están muy por debajo de los publicados en trabajos previos acerca de la extracción de pesticidas en pienso [2, 4, 7] y en grano de cereal [5, 13].

La Figura IV.2.11 muestra la superposición de los cromatogramas obtenidos, utilizando el procedimiento recomendado, para una muestra de pienso fortificada con todos los pesticidas estudiados a dos niveles de concentración: 20 ng g^{-1} y 5 ng g^{-1} .

2.2.7 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD

Se aplicó el método de MSPD optimizado a la extracción de **5 muestras de pienso** (A-E) con adición de 100 ng g^{-1} de los pesticidas estudiados. Además, la muestra A también se fortificó al nivel de 20 ng g^{-1} . Se calcularon las **recuperaciones** obtenidas para los analitos en las distintas muestras y los resultados se han incluido en la Tabla IV.2.7. Las recuperaciones estuvieron por encima del 75% para la mayoría de los compuestos y en todas las muestras, excepto para el aldehído de endrina. Las bajas recuperaciones observadas para este compuesto se pueden atribuir a su fuerte retención en adsorbentes sólidos. De hecho, otros autores han observado un comportamiento similar para este metabolito de la endrina [4, 12].

Por otro lado, se calculó la variabilidad entre los resultados obtenidos para las diferentes muestras fortificadas y, en general, se obtuvieron valores de RSD inferiores al 10% los cuales se pueden atribuir al error experimental (ver Tabla IV.2.6). Con estos resultados se puede concluir que el método MSPD-GC- μ ECD desarrollado permite la cuantificación de los pesticidas investigados en muestras de pienso de diferente composición.

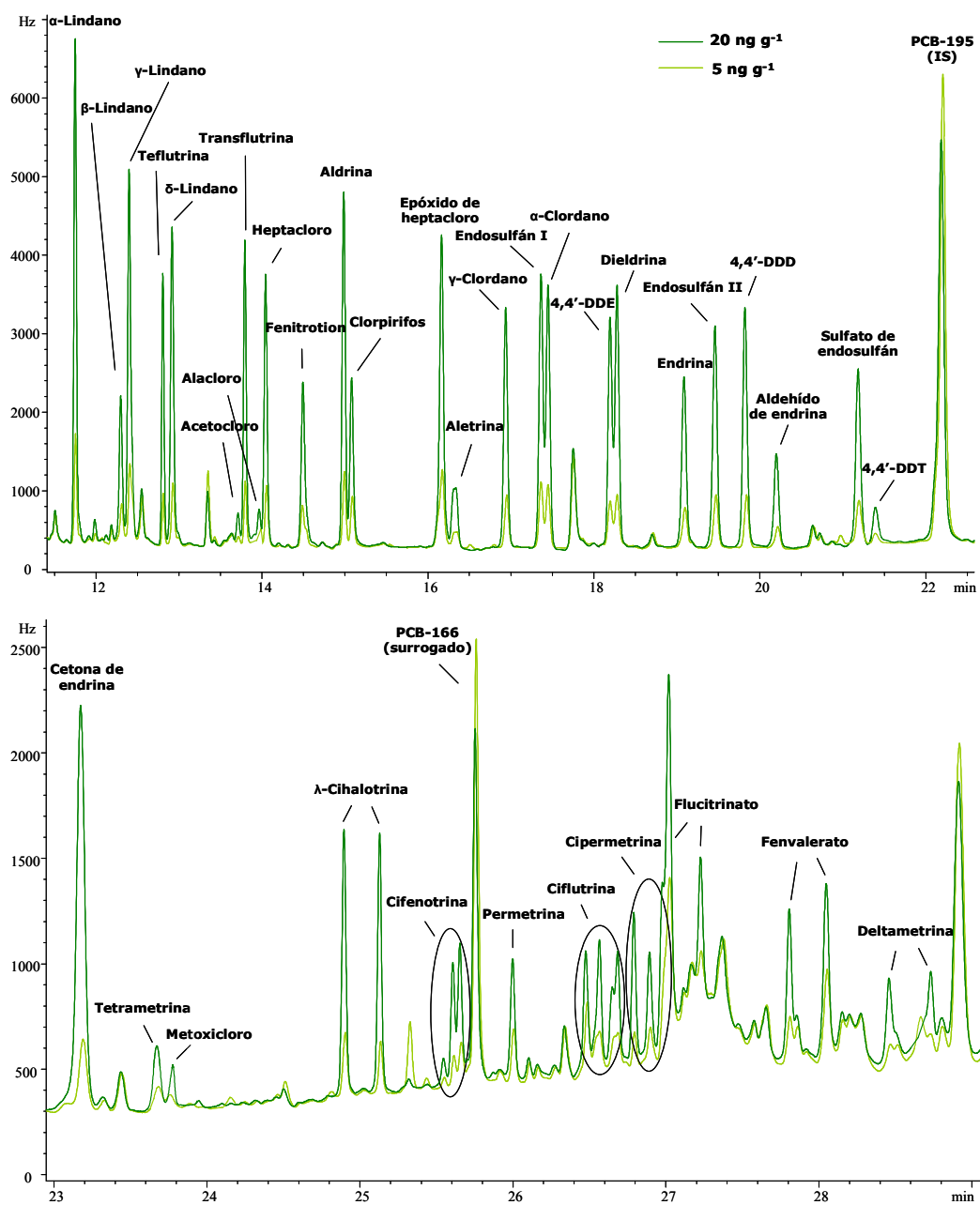


Figura IV.2.11 Superposición de los cromatogramas obtenidos en GC-μECD para una muestra de pienso con adición de 20 y 5 ng g⁻¹ siguiendo el procedimiento recomendado.

Tabla IV.2.7 Recuperaciones de los analitos en diferentes muestras de pienso.

Pesticida	Muestra de pienso					
	A	B	C	D	E	
	20 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹			
α-Lindano	96	90	80	88	77	79
β-Lindano	94	90	79	88	77	79
γ-Lindano	96	90	77	86	72	75
Teflutrina	125	97	85	91	82	85
δ-Lindano	94	91	80	90	78	78
Acetocloro	97	95	89	92	83	85
Transflutrina	102	92	88	92	82	87
Alacloro	76	88	87	90	80	82
Heptacloro	87	84	77	84	73	77
Fenitroton	100	92	80	98	76	76
Aldrina	95	91	80	89	79	81
Clorpirifos	88	86	83	91	77	80
Epóxido de heptacloro	92	91	81	88	78	80
Aletrina	98	92	78	91	83	80
γ-Clordano	96	93	83	91	80	83
Endosulfán I	107	85	86	87	75	84
α-Clordano	121	92	93	95	91	90
4,4'-DDE	95	93	84	92	81	84
Dieldrina	97	93	88	93	82	86
Endrina	100	96	91	98	84	90
Endosulfán II	91	94	80	89	73	81
4,4'-DDD	81	84	78	90	76	79
Aldehído de endrina	62	58	41	32	37	33
Sulfato de endosulfán	91	95	85	90	79	84
4,4'-DDT	102	111	79	85	73	81
Cetona de endrina	98	86	81	83	73	78
Tetrametrina	85	96	88	90	81	134
Metoxicloro	116	109	85	88	76	88
λ-Cihalotrina	82	81	79	84	71	82
Cifenoctrina	86	85	83	87	78	83
Permetrina	99	86	77	86	74	80
Ciflutrina	93	87	86	91	80	88
Cipermetrina	103	94	79	92	94	96
Flucitrinato	66	91	81	88	72	85
Fenvalerato	107	99	91	92	78	90
Deltametrina	86	86	76	85	69	77

La **exactitud** del método también se evaluó analizando **un material de referencia certificado** (BCR-115) conteniendo alguno de los fitosanitarios estudiados. La Tabla IV.2.8 muestra las concentraciones estimadas así como las correspondientes recuperaciones para los pesticidas organoclorados investigados. Tal y como se deduce de la tabla, los valores estimados concuerdan con los certificados. Además, en este material de referencia se detectaron otros organoclorados (α -lindano, aldrina, epóxido

de heptacloro y 4,4'-DDT) cuyas concentraciones no están certificadas. Sin embargo, en general, las concentraciones calculadas para estos compuestos concuerdan con las publicadas en trabajos previos. [3, 7, 14]

Tabla IV.2.8 Validación del método: análisis de un material de referencia certificado (BCR-115).

Pesticida	Valor estimado (ng g ⁻¹)	Recuperación (%)
HCB	17,8 ± 4,8	92
α-Lindano*	28,4 ± 3,0	
β-Lindano	22,2 ± 2,9	96
γ-Lindano	16,4 ± 3,0	75
Heptacloro	18,7 ± 1,4	99
Aldrina*	13,0 ± 2,2	
Epóxido de heptacloro*	18,2 ± 4,8	
γ-Clordano	44,3 ± 4,5	92
Endosulfán I	30,2 ± 2,8	66
4,4'-DDE	41,8 ± 2,5	89
Dieldrina	21,2 ± 3,7	118
Endrina	40,7 ± 5,7	89
p,p'-DDT*	52,7 ± 3,1	

*no certificado

Por lo tanto, se demostró **la idoneidad** del método de MSPD optimizado para el análisis de niveles traza de los pesticidas estudiados en muestras de pienso de ganado.

2.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PSE

Existen numerosos **parámetros** que pueden influir potencialmente en la eficacia de la extracción con disolventes presurizados:

- **variables específicas de PSE:** la temperatura y la presión de la extracción, el volumen de enjuague (*flush*), los tiempos de extracción y purga, o el número de ciclos y, por otro lado,
- **variables comunes** a los procesos de extracción sólido-líquido convencionales: naturaleza del disolvente, tamaño de muestra, etapas de limpieza.

Como ya se ha comentado en la Introducción (**Apartado 4.5.2, Capítulo I.4**), en general la presión tiene un efecto poco destacado en la eficacia de la extracción; por lo tanto, todos los experimentos se llevaron a cabo a **1500 psi** que es la presión de trabajo estándar en las extracciones por PSE. El volumen de enjuague (*flush*) y el **tiempo de purga** se fijaron en **60%** y **90 s**, respectivamente.

La influencia de las restantes variables se evaluó tal y como se describirá en los siguientes apartados. Los experimentos llevados a cabo a lo largo de la optimización del método se realizaron con muestras de pienso fortificadas. Puesto que el secado de la muestra es esencial, en todas las pruebas realizadas ésta se mezcló con **1 g de sulfato sódico anhidro**. Además, se utilizó arena lavada para evitar el volumen muerto en las celdas de PSE.

2.3.1 EXPERIMENTOS PREVIOS DE PSE

La PSE ofrece la posibilidad de evitar (o al menos simplificar) la limpieza exhaustiva de los extractos previa a su análisis cromatográfico. Esto se puede conseguir adicionando determinados **adsorbentes** a las celdas de extracción. De esta manera se puede evitar que lípidos u otras sustancias coextractables puedan llegar al extracto. Por esta razón se realizaron una serie de experimentos con y sin 1 g de adsorbente, concretamente Florisil, en la celda. El extracto obtenido de la celda sin Florisil era de color amarillo intenso y dio lugar a un cromatograma con un incremento obvio de la

línea base y de los artefactos cromatográficos comparado con el cromatograma obtenido cuando se introdujo Florisil (Figura IV.2.12).

Una vez comprobada la necesidad de introducir un **adsorbente de limpieza en la celda**, se procedió a evaluar diferentes adsorbentes. Con este fin,

se realizaron una serie de extracciones introduciendo en la celda 1 g de: Florisil, alúmina, una mezcla de ambos o sílica. Analizando los resultados obtenidos se concluyó que la sílica conducía a los peores perfiles cromatográficos, mientras que los cromatogramas más limpios se obtuvieron utilizando alúmina. Por otro lado, el uso simultáneo de Florisil y alúmina no supuso ninguna mejoría con respecto al cromatograma obtenido sólo con alúmina. Por tanto, en los experimentos posteriores se introdujo en las celdas **1 g de alúmina**.

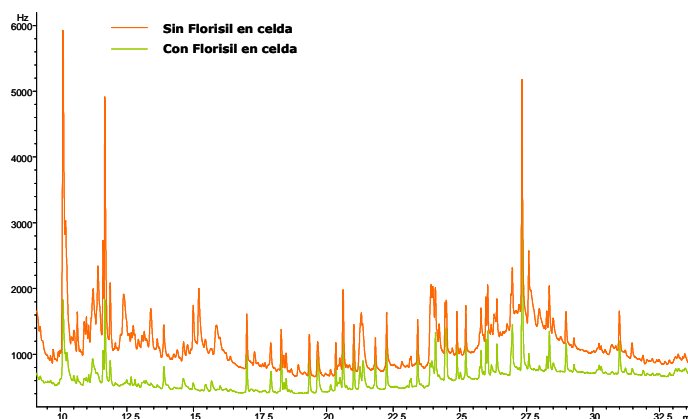


Figura IV.2.12 Superposición de los cromatogramas obtenidos en la extracción por PSE de una muestra de pienso fortificada, sin y con Florisil en celda, (columna VF-5MS de 50 m).

La siguiente variable estudiada fue el **número de ciclos**. Se realizaron pruebas en las que las extracciones fueron de 1 o 2 ciclos. Los resultados mostraron que la eficacia de la extracción no se veía mejorada al aumentar el número de ciclos. Además, el ruido de fondo se incrementó al utilizar 2 ciclos en lugar de 1. Estos resultados están de acuerdo con el método oficial de la EPA de PSE (método 3545) [15] que recomienda el uso de un solo ciclo para la extracción de compuestos semivolátiles, entre los que se encuentran pesticidas organoclorados y herbicidas. Además, el empleo de ciclos extra puede favorecer la co-extracción de compuestos interferentes, tal y como se ha observado en nuestro caso.

2.3.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PSE: DISEÑO FACTORIAL

La optimización de las restantes variables se llevó a cabo utilizando un **diseño experimental** con el objetivo de:

- detectar las variables más influyentes,
- encontrar los niveles óptimos de las variables estudiadas,
- evaluar posibles interacciones entre variables, y
- minimizar el número de experimentos necesarios para realizar los puntos anteriores.

Los factores estudiados y sus correspondientes niveles se muestran en la Tabla IV.2.9.

Tabla IV.2.9 Factores y niveles considerados en el diseño experimental.

Factor	Código	Nivel bajo (-)	Nivel intermedio	Nivel alto (+)	Continuo
Temperatura (°C)	A	80	100	120	Sí
Disolvente	B	acetona/hexano (1:1, v/v)		acetato de etilo	No
Tiempo (min)	C	5		15	Sí
Tamaño de muestra (g)	D	1		3	Sí

La **temperatura** es un parámetro importante que, en general, favorece las extracciones por PSE. Sin embargo, el uso de temperaturas demasiado altas también puede conllevar una serie de problemas relacionados con:

- la pérdida de selectividad, y/o
- la degradación de determinados compuestos, tal y como ha sido publicado para el DDT (a temperaturas por encima de los 120 °C) [16].

De manera que el factor temperatura (A) se evaluó a tres niveles: 80, 100 y 120 °C.

La elección del **disolvente** (B) apropiado es otro aspecto fundamental en el desarrollo de métodos de extracción. Este factor se estudió a dos niveles: acetona/hexano (1:1, v/v) y acetato de etilo. Otros autores ya habían demostrado que la mezcla acetona:hexano es apropiada para la extracción de pesticidas en pienso [3, 7] y otras matrices medioambientales [17]. Por otro lado, en otros estudios también se utilizó

acetato de etilo para la extracción de pesticidas de carne y otras matrices alimentarias [18, 19]. Además, en el presente trabajo el acetato de etilo también se ha aplicado con éxito en el método de MSPD desarrollado para piensos.

En lo que respecta al **tiempo de extracción** (C), se evaluaron dos niveles (5 y 10 min). Finalmente, se evaluaron dos **tamaños de muestra** (D): 1 y 3 g.

En este caso se propuso un **diseño fraccionado de nivel mixto ($3 \cdot 2^{3-1}$)**. A diferencia de otros diseños de *screening*, éste permite evaluar un factor cuantitativo (A) a tres niveles. La **resolución del diseño es V**, por lo que permite estimar todos los efectos principales y las interacciones entre dos factores. Además, se añadieron **dos puntos centrales** con el objetivo de incrementar los grados de libertad para evaluar el error experimental. La matriz de experimentos proporcionada por el programa **Statgraphics XV Centurion** se muestra en la Tabla IV.2.10.

Tabla IV.2.10 Matriz de experimentos para el diseño experimental $3 \cdot 2^{3-1}$.

Experiencia	Temperatura (°C)	Disolvente	Tiempo (min)	Tamaño de muestra (g)
1*	100	Acetona:Hexano	10	2
2	80	Acetona:Hexano	5	1
3	80	Acetona:Hexano	15	3
4	80	Acetato de etilo	5	3
5	80	Acetato de etilo	15	1
6	100	Acetona:Hexano	5	3
7	100	Acetona:Hexano	15	1
8	100	Acetato de etilo	5	1
9	100	Acetato de etilo	15	3
10	120	Acetona:Hexano	5	1
11	120	Acetona:Hexano	15	3
12	120	Acetato de etilo	5	3
13	120	Acetato de etilo	15	1
14*	100	Acetato de etilo	10	2

*puntos centrales

En todos los experimentos del diseño, la celda de extracción se llenó con 1 g de alúmina, seguido de la mezcla entre la muestra fortificada (100 ng g^{-1}) y 1 g de sulfato

sódico anhidro. El volumen muerto se completó con arena lavada y se colocaron filtros de celulosa en ambos extremos de la celda. Los parámetros instrumentales fueron los detallados previamente: 60% de volumen de enjuague, tiempo de purga de 90 s, 1500 psi y 1 ciclo estático.

Los resultados del diseño experimental se pueden interpretar con facilidad visualizando varias herramientas estadísticas proporcionadas por Statgraphics, y que se comentan con más detalle en los siguientes apartados.

2.3.2.1 Cartas Pareto y gráficos de efectos principales

En la Figura IV.2.13 se han incluido algunas de las **cartas Pareto** obtenidas que ejemplifican el comportamiento general de los pesticidas investigados. Como ya se ha explicado en el Capítulo IV.1, en una carta Pareto se representan los efectos estandarizados de cada factor e interacción en orden decreciente de magnitud absoluta. De esta manera, es fácil ver cuáles son los factores e interacciones más influyentes. Además, la línea vertical correspondiente al nivel de significación especificado (en este caso, **95%**) permite saber si un efecto es estadísticamente significativo.

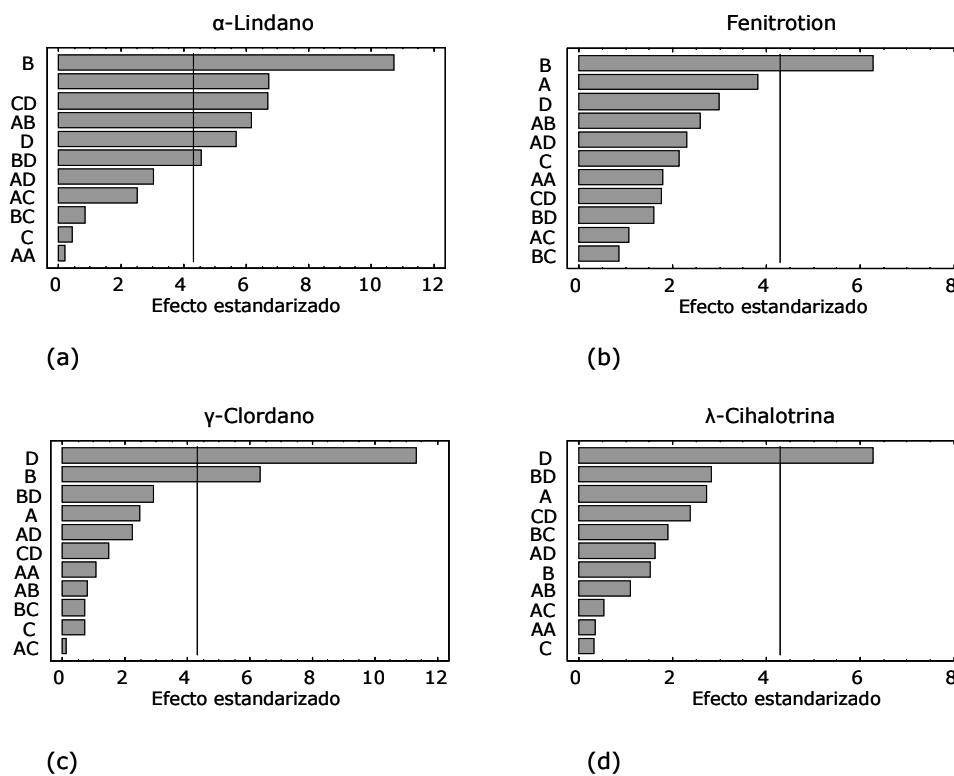
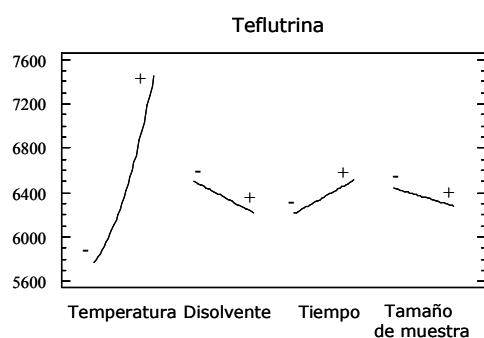
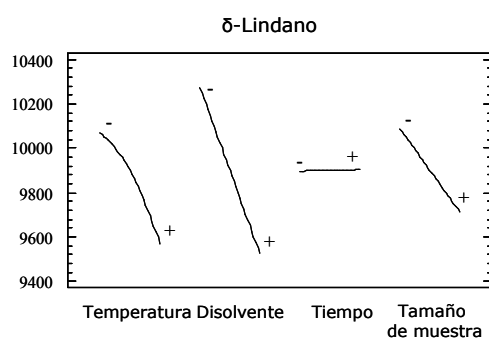


Figura IV.2.13 Cartas Pareto para: (a) α -lindano; (b) fenitrothion; (c) γ -clordano; (d) λ -cihalotrina.

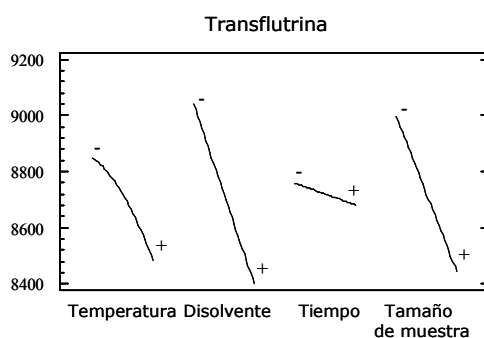
Por otro lado, los **gráficos de efectos principales** (Figura IV.2.14) muestran cómo varía la respuesta cuando cada factor en particular cambia de su nivel bajo al alto, mientras que los otros factores se mantienen en el centro del dominio experimental.



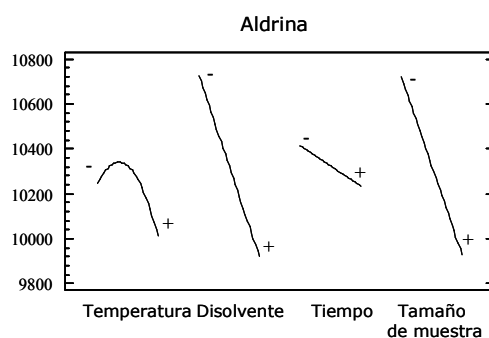
(a)



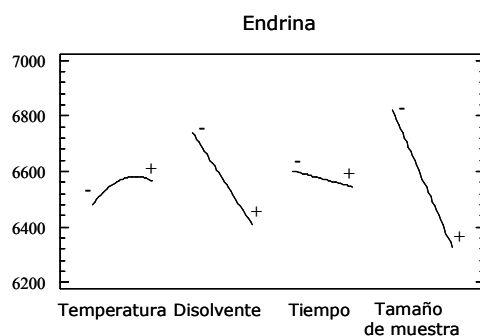
(b)



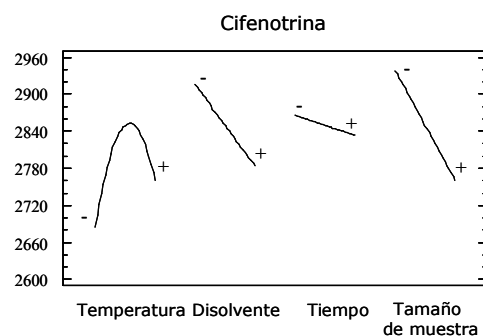
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura IV.2.14 Gráficos de efectos principales para: (a) teflutrina; (b) δ-lindano; (c) transflutrina; (d) aldrina; (e) endrina; (f) cifenotrina.

Analizando las cartas Pareto (Figura IV.2.13) se concluyó que el disolvente (B) y el tamaño de muestra (D) fueron los parámetros que más influyeron en la eficacia de la extracción.

Para la mayoría de los pesticidas para los que el factor B fue significativo, la mezcla **acetona/hexano** condujo a mayores recuperaciones (Figura IV.2.14). Por lo que esta mezcla fue el disolvente seleccionado para la extracción de los pesticidas estudiados en pieles.

En lo que respecta al **tamaño de muestra**, en general, su efecto fue negativo, lo que quiere decir que se consiguieron extracciones más eficientes al trabajar con **1 g** de muestra (Figura IV.2.14).

La influencia de la **temperatura de extracción** (A) no fue tan importante en el rango estudiado. De hecho, este parámetro sólo fue estadísticamente significativo para 4 de los 36 analitos: α - y δ -lindano, teflutrina y aldehído de endrina. En el caso de los lindanos (ver Figura IV.2.14 para δ -lindano), la temperatura óptima fue 80 °C, mientras que 120 y 107 °C fueron las temperaturas más favorables para la teflutrina (ver Figura IV.2.14) y para el aldehído de endrina, respectivamente. Se tomó una solución de compromiso seleccionando **100 °C** como la temperatura de extracción más satisfactoria.

Finalmente, el **tiempo de extracción** (D) no fue una variable significativa para ninguno de los compuestos estudiados. De manera que se seleccionó **5 min** como el tiempo de extracción más adecuado a fin de hacer experimentos lo más cortos posible y de incrementar, de este modo, la capacidad de procesamiento de muestras del método.

2.3.2.2 Gráficos de interacciones

La Tabla IV.2.10 resume las condiciones óptimas para la extracción de los pesticidas estudiados. Las últimas columnas también incluyen los **efectos de interacción significativos**.

De esta tabla se deduce que sólo ocho analitos mostraron efectos de interacción significativos; además, a diferencia de en otras ocasiones, estas interacciones no modificaron las condiciones óptimas seleccionadas tras el análisis de los efectos principales. A modo de ejemplo, en la

Figura IV.2.15 se muestran los **gráficos de interacción** para la interacciones temperatura-disolvente (AB) y disolvente-tamaño de muestra (BD) del γ -lindano y de la aldrina.

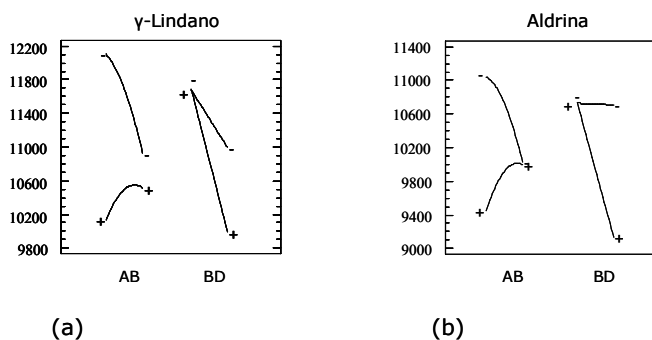


Figura IV.2.15 Gráficos de interacción temperatura-disolvente (AB) y disolvente-tamaño de muestra (BD) para: (a) γ -lindano; (b) aldrina.

La **interacción AB** fue significativa para α -, γ - y δ -lindano, aldrina, aldehído de endrina y cetona de endrina. En estos casos, cuando se trabajó a 120 °C se observaron pequeñas diferencias entre las respuestas obtenidas con uno y otro disolvente; sin embargo, a 80 °C estas diferencias fueron importantes y se obtuvieron mejores resultados al utilizar acetona/hexano como disolvente.

Con respecto a la **interacción BD**, en general, la extracción de 1 g de pienso con ambos disolventes condujo a resultados comparables, mientras que cuando el tamaño de muestra era de 3 g se consiguieron mejores eficacias trabajando con acetona/hexano.

Tabla IV.2.10 Condiciones experimentales óptimas dadas para cada compuesto por el diseño fraccional de nivel mixto $3 \cdot 2^{3-1}$. A/H (acetona/hexano), AE (acetato de etilo).

	Factores				Interacciones					
	Temperatura (°C)	Disolvente	Tiempo (min)	Tamaño de muestra (g)	AB	AC	AD	BC	BD	CD
α -Lindano	80	A/H	5	1	*				*	*
β -Lindano	80	A/H	5	1						
γ -Lindano	80	A/H	5	3	*	*	*		*	*
Teflutrina	120	AE	15	1						
δ -Lindano	80	A/H	5	3	*	*	*		*	*
Acetocloro	80	AE	5	1						
Transflutrina	80	A/H	5	1						*
Alacloro	80	AE	15	1						
Heptacloro	80	A/H	15	1						
Fenitrothion	80	A/H	15	1						
Aldrina	80	A/H	5	1	*				*	*
Clorpirifos	80	A/H	15	1						
Epóxido de heptacloro	80	A/H	15	1						
Aletrina	115	A/H	15	1						
γ -Clordano	80	A/H	5	1						
4,4'-DDE	80	A/H	15	1						
Dieldrina	80	A/H	15	1						
Endrina	120	A/H	15	1		*	*	*	*	*
Endosulfán II	101	A/H	5	1						
4,4'-DDD	104	A/H	5	1						
Aldehído de endrina	107	AE	15	1	*			*	*	*
Sulfato de endosulfán	111	A/H	5	1						
4,4'-DDT	120	A/H	5	1						
Cetona de endrina	80	A/H	15	1	*					
Tetrametrina	80	A/H	5	1						
Metoxicloro	93	A/H	5	1						
λ -Cihalotrina	120	AE	15	1						
Cifentotrina	108	A/H	5	1						
Permetrina	109	AE	15	1						
Ciflutrina	80	A/H	15	1						
Cipermetrina	80	AE	15	1						
Fenvalerato	120	A/H	15	1						
Deltametrina	85	AE	5	1						

Tras la optimización de los factores investigados, el **procedimiento recomendado** para la extracción simultánea de los pesticidas estudiados mediante PSE fue el especificado en la Tabla IV.2.11, en la que se incluyen los niveles óptimos para cada una de las variables estudiadas mediante el diseño experimental, así como los factores que no han variado durante estos experimentos.

Tabla IV.2.11 Niveles óptimos de los factores estudiados y variables fijas.

Factores estudiados	Óptimo
Temperatura (°C)	100
Disolvente	acetona/hexano (1:1, v/v)
Tiempo (min)	5
Tamaño de muestra (g)	1
Factores fijos	
Presión (psi)	1500
Volumen de enjuague (flush)	60%
Tiempo de purga (s)	90
Adsorbente en celda	alúmina
Cantidad de adsorbente (g)	1
Nº de ciclos	1

2.3.3 INFLUENCIA DEL NÚMERO Y TIPO DE FILTROS

Se llevaron a cabo una serie de experimentos en relación al **número y tipo de filtros** colocados en el extremo inferior de las celdas de PSE. En primer lugar, se observó que el uso de **2 filtros en lugar de 1** conducía a extractos más claros.

Por otro lado, se compararon **filtros de celulosa** con **filtros de fibra de vidrio** y no se observaron diferencias entre ellos. Sin embargo, por motivos económicos, se eligieron los filtros de celulosa (bastante más baratos que los de fibra de vidrio). Por tanto, en los experimentos posteriores se colocaron uno y dos filtros de celulosa en los extremos superior e inferior de la celda, respectivamente.

2.3.4 CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Al igual que en el método de MSPD desarrollado en este trabajo, en este caso también se recurrió a la evaporación a sequedad de alícuotas de 1 mL de los extractos de PSE y a su posterior redilución con 200 µL de acetato de etilo. De esta manera se consiguió **quintuplicar** las áreas de pico de los pesticidas investigados con respecto a las respuestas obtenidas para los extractos sin concentrar.

2.3.5 PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Debido a la complejidad de las matrices estudiadas y, a pesar de incluir una capa de 1 g de alúmina en la celda de extracción, se consideró necesario eliminar compuestos interferentes todavía presentes en el eluato para así minimizar los efectos adversos derivados en la detección de los analitos. Con este objetivo, se evaluaron otros **procedimientos de limpieza adicionales**.

En primer lugar, en la celda de PSE se colocó una **capa de 0,5 g de carbón no-poroso grafitizado** sobre la alúmina. Siguiendo este procedimiento, en la mayoría de los casos se consiguieron extractos incoloros y libres de residuos grasos, obteniéndose de esta manera **mejores perfiles cromatográficos**. En general, estos extractos fueron lo suficientemente limpios como para ser analizados directamente, incluso tras su concentración.

Sin embargo, en el caso de **muestras extremadamente complejas**, esta etapa extra de limpieza *in situ* no fue suficiente, por lo que fue necesario buscar un procedimiento adicional para la limpieza de los extractos. Así, se llevaron a cabo varias **SPEs clásicas** utilizando cartuchos de Sílica, Alúmina N, Florisil, y C₁₈ Sep-Pack. Alternativamente, también se evaluó la SPE dispersiva utilizando alúmina, Florisil, una mezcla de ambos, PSA, y sílica. Utilizando ambos procedimientos (**Apartado 2.1.4**) la **alúmina** condujo a buenos y similares resultados, aunque el ruido de fondo cromatográfico fue inferior para los extractos obtenidos mediante **dSPE**. Trabajando de este modo, en algunas muestras todavía aparecieron algunos picos cromatográficos interferentes, aunque la mayoría de ellos no impidieron la detección y cuantificación de los analitos.

En definitiva, de aquí en adelante, en todas las extracciones se añadió a las celdas una **capa de 0,5 g de carbón no-poroso grafitizado sobre la alúmina** y, en aquellos casos en los que se requirió una etapa de limpieza adicional para eliminar ciertos componentes de la matriz coextraídos, los eluatos se purificaron por **dSPE utilizando alúmina como adsorbente**. En la Figura IV.2.16 se superponen los cromatogramas correspondientes a una muestra de pienso lo suficientemente compleja como para que fuese necesaria dicha etapa de limpieza adicional. Así, uno de los cromatogramas

(violeta) se corresponde con la extracción por PSE utilizando las condiciones propuestas a partir del diseño e introduciendo carbón activo en la celda, mientras que el otro cromatograma (azul) se corresponde con el extracto obtenido en la extracción anterior pero sometido a una limpieza a posteriori mediante dSPE.

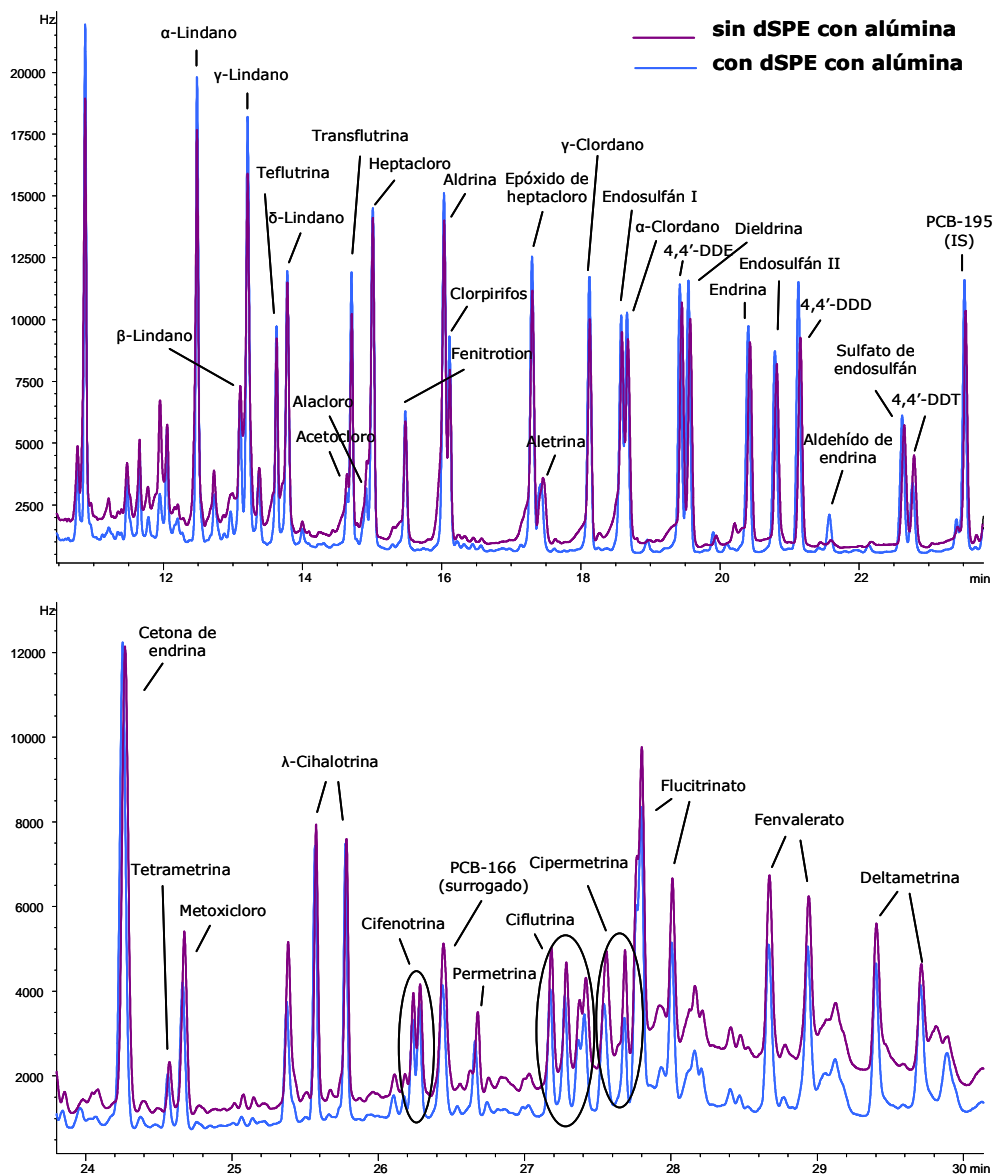


Figura IV.2.16 Superposición de los cromatogramas obtenidos para la extracción de una muestra muy compleja sin y con etapa posterior de limpieza.

2.3.6 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO

Se estimaron los **parámetros de calidad del método** con el objetivo de verificar que el método PSE-GC- μ ECD desarrollado es adecuado para la determinación cuantitativa de pesticidas en pienso. (Tabla IV.2.12)

En primer lugar se evaluó la **linealidad instrumental** en un rango de concentraciones comprendido entre 1 y 100 ng mL⁻¹ utilizando disoluciones estándar preparadas en acetato de etilo. Se consideraron 6 niveles de concentración, cada uno de los cuales se inyectó por triplicado. Se comprobó la linealidad en la respuesta para todos los analitos, obteniéndose coeficientes de correlación (R) por encima de 0,9983.

Para la estimación de la precisión y de los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método, se analizaron muestras de pienso fortificadas con concentraciones conocidas de los pesticidas estudiados.

La **precisión** del método se evaluó en un mismo día (**repetibilidad**) y entre varios días (**reproducibilidad**) a dos niveles de concentración (20 y 100 ng g⁻¹). Los resultados obtenidos (RSD, %) se han incluido en la Tabla IV.2.12. En lo que respecta a la repetibilidad del método, los resultados obtenidos están comprendidos entre el 2,4% y el 14%, con un valor medio de 7,6%; mientras que para la variabilidad entre días la media fue de 11%, con valores comprendidos entre el 3,0% y el 21%.

Los **LODs y LOQs** del método se calcularon de la misma manera que en los estudios anteriores. Para estimar estos límites se empleó el extracto obtenido para una muestra de pienso con adición de 5 ng g⁻¹ de los analitos. Tanto los LODs como los LOQs son del orden del bajo ng g⁻¹ o inferiores al ng g⁻¹, y ambos están además por debajo de los MRLs establecidos para los residuos de pesticidas en cereales y en pienso animal establecidos por la legislación europea (ver Tabla I.1.2 de la Introducción). Además, los LODs están por debajo de los publicados en estudios previos acerca de la extracción de pesticidas de la misma matriz [2-5, 7] y muy próximos a los obtenidos en el presente trabajo usando MSPD.

Tabla IV.2.12 Precisión, linealidad y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método propuesto.

Pesticida	Linealidad R	Precisión (RSD, %)			LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
		Repetibilidad		Reproducibilidad		
		20 ng/g (n=3)	100 ng/g (n=3)	20 ng/g (n=5 d)		
α -Lindano	0,9996	9,3	5,6	14	0,05	0,17
β -Lindano	0,9998	3,5	4,9	12	0,20	0,67
γ -Lindano	0,9997	7,6	6,2	7,0	0,09	0,30
Teflutrina	0,9994	6,8	9,9	12	0,12	0,40
δ -Lindano	0,9993	6,3	6,6	12	0,10	0,33
Acetocloro	0,9999	3,6	7,9	3,6	1,8	6,0
Transflutrina	0,9996	13	3,8	11	0,10	0,33
Alaclaro	0,9988	12	8,7	12	1,8	6,0
Heptaclaro	0,9998	9,8	5,2	14	0,09	0,30
Fenitrotrion	1,0000	7,2	5,6	6,0	0,09	0,30
Aldrina	1,0000	5,6	6,8	7,0	0,10	0,33
Clorpirifos	0,9997	6,2	6,2	8,7	0,12	0,40
Epóxido de heptaclaro	0,9998	5,6	6,4	4,8	0,09	0,30
Aletrina	0,9999	4,1	5,6	11	0,30	1,0
γ -Clordano	0,9998	10	5,8	14	0,09	0,30
Endosulfán I	0,9998	11	5,8	8,0	0,10	0,33
α -Clordano	0,9999	8,3	5,9	9,2	0,12	0,40
4,4'-DDE	0,9992	7,3	5,7	11	0,11	0,37
Dieldrina	0,9999	8,1	5,9	14	0,11	0,37
Endrina	0,9997	5,1	6,5	9,4	0,10	0,33
Endosulfán II	0,9998	10	6,8	10	0,09	0,30
4,4'-DDD	0,9994	7,3	6,8	10	0,09	0,30
Aldehído de endrina	0,9999	11	11	20	0,25	0,83
Sulfato de endosulfán	0,9998	10	6,8	8,5	0,13	0,43
4,4'-DDT	0,9993	14	6,1	20	0,30	1,0
Cetona de endrina	0,9999	10	7,5	11	0,12	0,40
Tetrametrina	0,9996	11	8,6	8,7	0,80	2,7
Metoxicloro	0,9999	11	6,1	20	0,70	2,3
λ -Cihalotrina	0,9993	6,9	6,7	8,6	0,24	0,80
Cifenotrina	0,9995	7,8	6,6	12	0,48	1,6
Permetrina	1,0000	12	5,9	21	1,5	5,0
Ciflutrina	0,9983	3,4	8,2	3,9	1,3	4,3
Cipermetrina	0,9990	10	7,8	10	0,60	2,0
Flucitrinato	0,9993	2,4	8,3	3,0	0,90	3,0
Fenvalerato	0,9996	14	10	11	1,3	4,4
Deltametrina	0,9993	14	5,1	11	1,5	5,0

La Figura IV.2.17 muestra el cromatograma obtenido para una muestra de pienso fortificada con todos los pesticidas estudiados a un nivel de concentración de 20 ng g^{-1} .

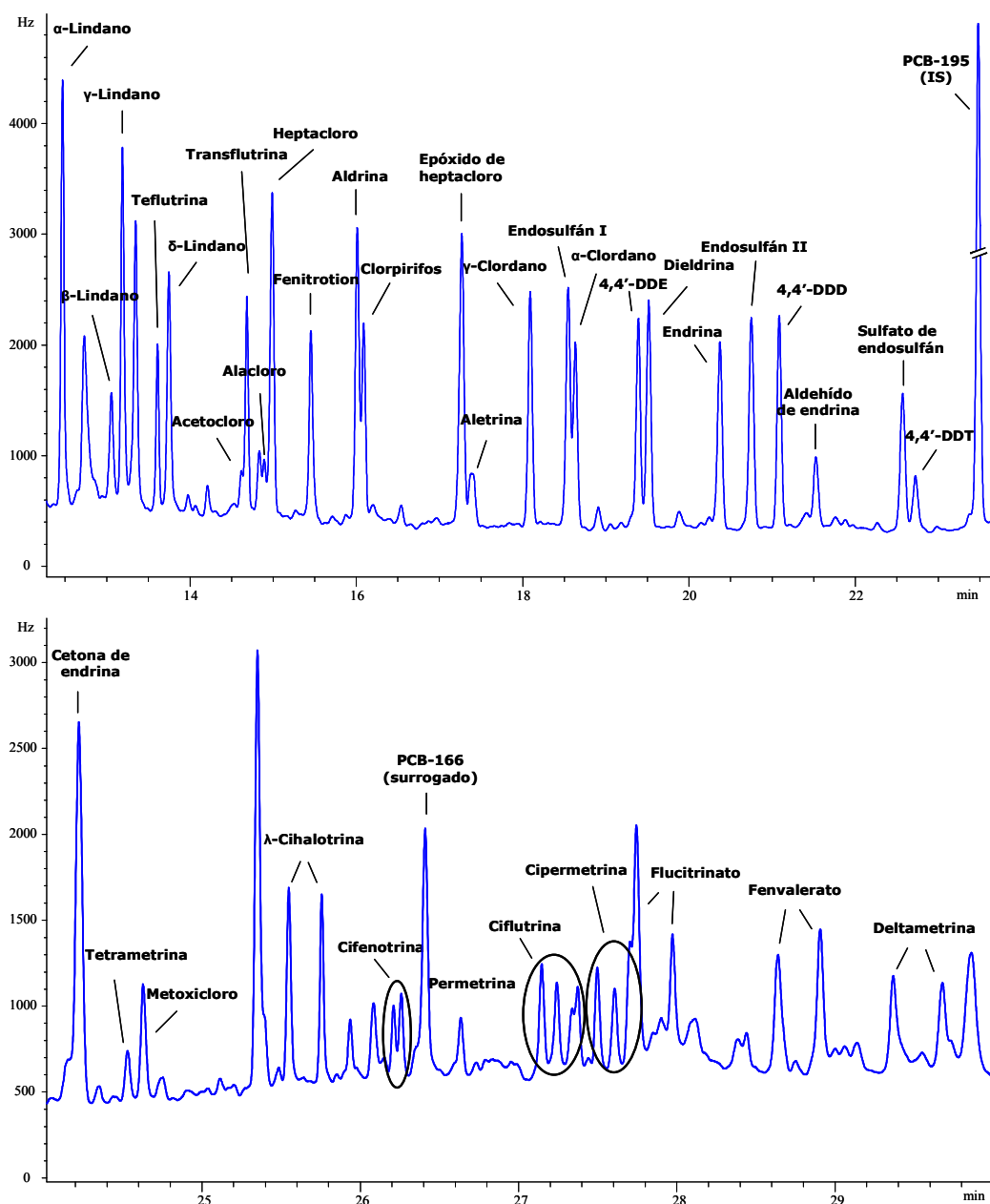


Figura IV.2.17 Cromatograma PSE-GC- μ ECD para una muestra de pienso (con adición de 20 ng g^{-1} de los pesticidas investigados) obtenido siguiendo el método propuesto.

2.3.7 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD

Se llevaron a cabo **estudios de recuperación** aplicando la metodología optimizada a la extracción de cinco muestras de pienso (A, F-I) con adición de 100 ng g^{-1} de los pesticidas estudiados. La muestra A también se fortificó a un nivel de 20 ng g^{-1} . El análisis previo de algunas de estas muestras mostró la presencia de algunos de los analitos a niveles de concentración inferiores a 10 ng g^{-1} , y estas concentraciones iniciales se tuvieron en cuenta a la hora de calcular las recuperaciones. Los resultados obtenidos se han incluido en la Tabla IV.2.13, de la que se deduce que las recuperaciones de los compuestos investigados están, en general, comprendidas entre un 70 y un 110%. De nuevo, como ocurrió con el método de MSPD, se observaron recuperaciones muy bajas para el aldehído de endrina (<45%); mientras que la coelución de una interferencia impidió la cuantificación de la aletrina en la muestra F. La media de la variabilidad entre muestras para los compuestos estudiados es del 9% (RSD), de tal manera que se puede concluir que las variaciones observadas entre las diferentes muestras de pienso se pueden atribuir al error experimental. Lo que quiere decir que el método PSE-GC- μ ECD desarrollado permite la cuantificación de los pesticidas investigados en muestras de pienso de diferente composición.

La **exactitud** del método también se evaluó analizando el material de referencia BCR-115, es decir, el mismo que se utilizó para la validación del método de MSPD. La Tabla IV.2.14 muestra las concentraciones estimadas y los valores de recuperación para los organoclorados estudiados. Para γ -clordano, β -lindano, γ -lindano, 4,4'-DDE, dieldrina, endosulfán I, endrina y heptacloro, los valores obtenidos concuerdan con los certificados. También se cuantificaron los pesticidas presentes en el material pero cuya concentración no está certificada (α -lindano, aldrina, epóxido de heptacloro, 4,4'-DDD y 4,4'-DDT). Los resultados obtenidos para estos pesticidas están alrededor o por debajo del máximo contenido posible de estos compuestos en el material [14].

Tabla IV.2.13 Recuperaciones de los pesticidas investigados en diferentes muestras de pienso fortificadas.

Pesticida	muestra					
	A		F	G	H	I
	20 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹			
α -Lindano	94	98	93	91	99	90
β -Lindano	86	95	85	90	90	85
γ -Lindano	80	93	91	84	85	90
Teflutrina	73	87	94	70	77	82
δ -Lindano	78	103	79	101	94	88
Acetocloro	67	91	109	110	91	114
Transflutrina	74	94	91	85	80	82
Alacloro	78	101	110	89	96	98
Heptacloro	71	89	88	75	79	76
Fenitrotion	74	101	87	92	103	82
Aldrina	78	90	101	86	86	84
Clorpirifos	78	85	84	80	77	76
Epóxido de heptacloro	84	90	88	89	87	75
Aletrina	79	86	-	74	78	84
γ -Clordano	77	86	83	71	73	76
Endosulfán I	60	80	85	72	77	72
α -Clordano	60	74	78	72	73	70
4,4'-DDE	86	92	91	80	81	83
Dieldrina	73	83	80	71	72	73
Endrina	88	91	85	79	81	81
Endosulfán II	86	81	75	72	72	73
4,4'-DDD	74	80	85	81	81	87
Aldehído de endrina	25	31	30	25	44	21
Sulfato de endosulfán	68	72	72	72	78	65
4,4'-DDT	114	101	86	81	88	58
Cetona de endrina	77	82	83	76	82	66
Tetrametrina	79	80	100	80	100	81
Metoxicloro	116	113	100	85	96	67
λ -Cihalotrina	90	93	99	90	94	85
Cifenotrina	94	102	107	98	99	100
Permetrina	120	107	103	101	100	81
Ciflutrina	95	102	108	103	104	94
Cipermetrina	92	95	107	91	99	101
Flucitrinato	98	101	110	100	105	116
Fenvalerato	119	109	100	107	114	120
Deltametrina	97	106	105	102	109	98

Tabla IV.2.14 Validación del método: Análisis de un material de referencia certificado (BCR-115).

Pesticida	Concentración estimada (ng g ⁻¹)	Recuperaciones (%)
α-Lindano*	18,7±1,0	
β-Lindano	24,9±1,0	108
γ-Lindano	21,3±1,8	98
Heptacloro	22,0±3,4	116
Aldrina*	15,1±4,1	
Epóxido de heptacloro*	22,5±5,4	
γ-Clordano	38,6±5,6	80
Endosulfán I	30,3±3,3	66
4,4'-DDE	39,9±4,2	85
Dieldrina	11,9±0,8	66
Endrina	42,5±7,9	92
p,p'-DDD*	43,8±8,6	
p,p'-DDT*	35,6±5,4	

*no certificado

Por lo tanto, se demostró que el método propuesto basado en la extracción con disolventes presurizados también es **apropiado** para el análisis de niveles traza de pesticidas en pienso de ganado.

2.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PIENSO REALES

Una vez demostrada la validez de los métodos MSPD-GC-μECD y PSE-GC-μECD desarrollados para la determinación de niveles traza de fitosanitarios en muestras de pienso, ambos procedimientos se aplicaron al análisis de muestras reales recogidas en 23 granjas de productos lácteos localizadas en Galicia. Algunas de estas muestras se analizaron por **GC-MS** para confirmar los posibles positivos.

En la Tabla IV.2.15 se incluyen las concentraciones estimadas para los pesticidas detectados en las muestras con algún positivo. En alguna de las muestras analizadas se detectaron residuos de estos pesticidas a niveles por encima de los MRLs. Así, en las muestras M₂ y U se detectó **β-lindano** a niveles de 5,7 y 5,6 ng g⁻¹, respectivamente, en la muestra K₂ se detectó **fenitrothion** a un nivel de 14 ng g⁻¹, y en la muestra Y se detectó **clorpirifos** a un nivel de concentración de 71 ng g⁻¹. El cromatograma de ion correspondiente a la muestra Y así como el espectro de masas del clorpirifos se muestran en la Figura IV.2.18.

Tabla IV.2.15 Concentraciones calculadas de los pesticidas identificados en las muestras de pienso reales con algún positivo (n.d. no detectado). Las muestras denotadas con la(s) misma(s) letra(s) pero con diferentes subíndices se refieren a muestras recogidas en la misma explotación.

muestra	concentración calculada (ng g ⁻¹)								
	Aldehído de endrína	β-Lindano	Alacloro	Fenitroton	Clorpirifos	Endosulfán I	Endosulfán II	Sulfato de endosulfán	Tetrametrina
J	n.d.	n.d.	n.d.	9,3	n.d.	3,7	3,8	3,8	n.d.
K ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,3	n.d.	n.d.	n.d.
K ₂	n.d.	n.d.	n.d.	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,3	n.d.	n.d.	n.d.
M ₁	n.d.	n.d.	n.d.	7,4	n.d.	3,4	2,5	2,8	n.d.
M ₂	3,1	5,7	n.d.	n.d.	7,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,1	2,4	n.d.	n.d.
O	n.d.	n.d.	n.d.	4,3	n.d.	n.d.	1,9	n.d.	1,8
P	n.d.	n.d.	3,4	3,9	n.d.	n.d.	2,0	n.d.	n.d.
Q	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
R	n.d.	n.d.	n.d.	2,6	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17
U	4,0	5,6	n.d.	7,2	8,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,0	2,8	3,4	n.d.
W	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,1	n.d.	n.d.	n.d.
X	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,8	2,5	1,7	n.d.
Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	71	5,3	n.d.	n.d.	n.d.

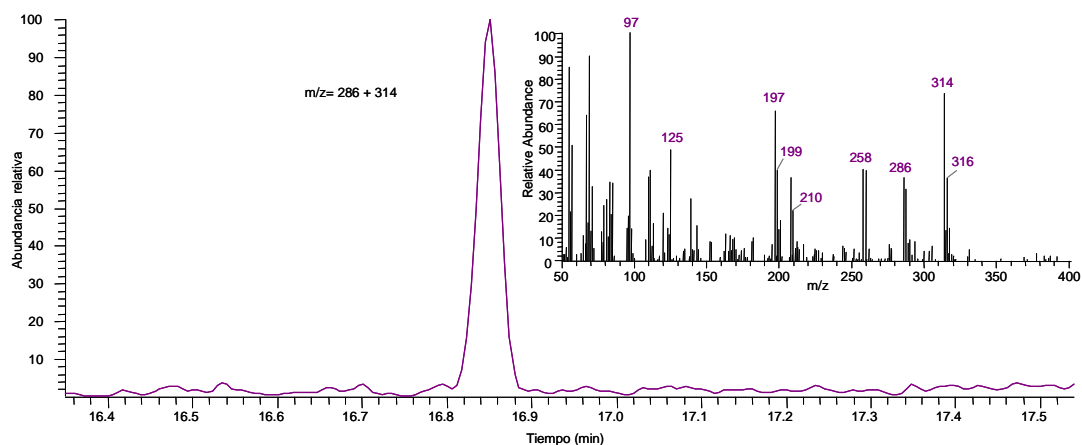


Figura IV.2.18 Cromatograma de ion (m/z 286+314) obtenido para el análisis mediante GC-MS de la muestra de pienso Y contaminada con clorpirifos. También se muestra el espectro de masas correspondiente.

El clorpirifos se encontró en otras cuatro muestras a concentraciones inferiores ($0,2$ - $8,0$ ng g^{-1}) y el fenitrothion en otras seis ($2,6$ - $9,3$ ng g^{-1}). Otros pesticidas objetivo detectados a bajos niveles fueron: aldehído de endrina ($3,1$ - $4,0$ ng g^{-1}), alacloro ($3,4$ ng g^{-1}), endosulfán I ($1,1$ - $5,3$ ng g^{-1}), endosulfán II ($1,9$ - $3,8$ ng g^{-1}), sulfato de endosulfán ($1,7$ - $3,8$ ng g^{-1}), y tetrametrina ($1,8$ - 17 ng g^{-1}).

En la Tabla IV.2.16 se comparan las concentraciones estimadas para cada uno de los pesticidas detectados en las muestras J e Y utilizando uno y otro procedimiento. De los resultados incluidos en esta tabla se concluye que utilizando ambas metodologías, MSPD-GC- μ ECD y PSE-GC- μ ECD, se obtienen resultados equivalentes.

Tabla IV.2.16 Análisis comparativo de las muestras de pienso J e Y utilizando los métodos de PSE y MSPD desarrollados en este trabajo (n.d. no detectado).

Pesticida	Concentración (ng g^{-1})			
	muestra J		muestra Y	
	PSE	MSPD	PSE	MSPD
Fenitrothion	$8,7 \pm 1,5$	$9,3 \pm 2,0$	n.d.	n.d.
Clorpirifos	n.d.	n.d.	$79 \pm 4,9$	$71 \pm 1,6$
Endosulfán I	$3,4 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,1$
Endosulfán II	$3,9 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,1$	n.d.	n.d.
Sulfato de endosulfán	$3,3 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,7$	n.d.	n.d.

En la Figura IV.2.19 se muestran los cromatogramas obtenidos para la muestra J extraída mediante MSPD y PSE.

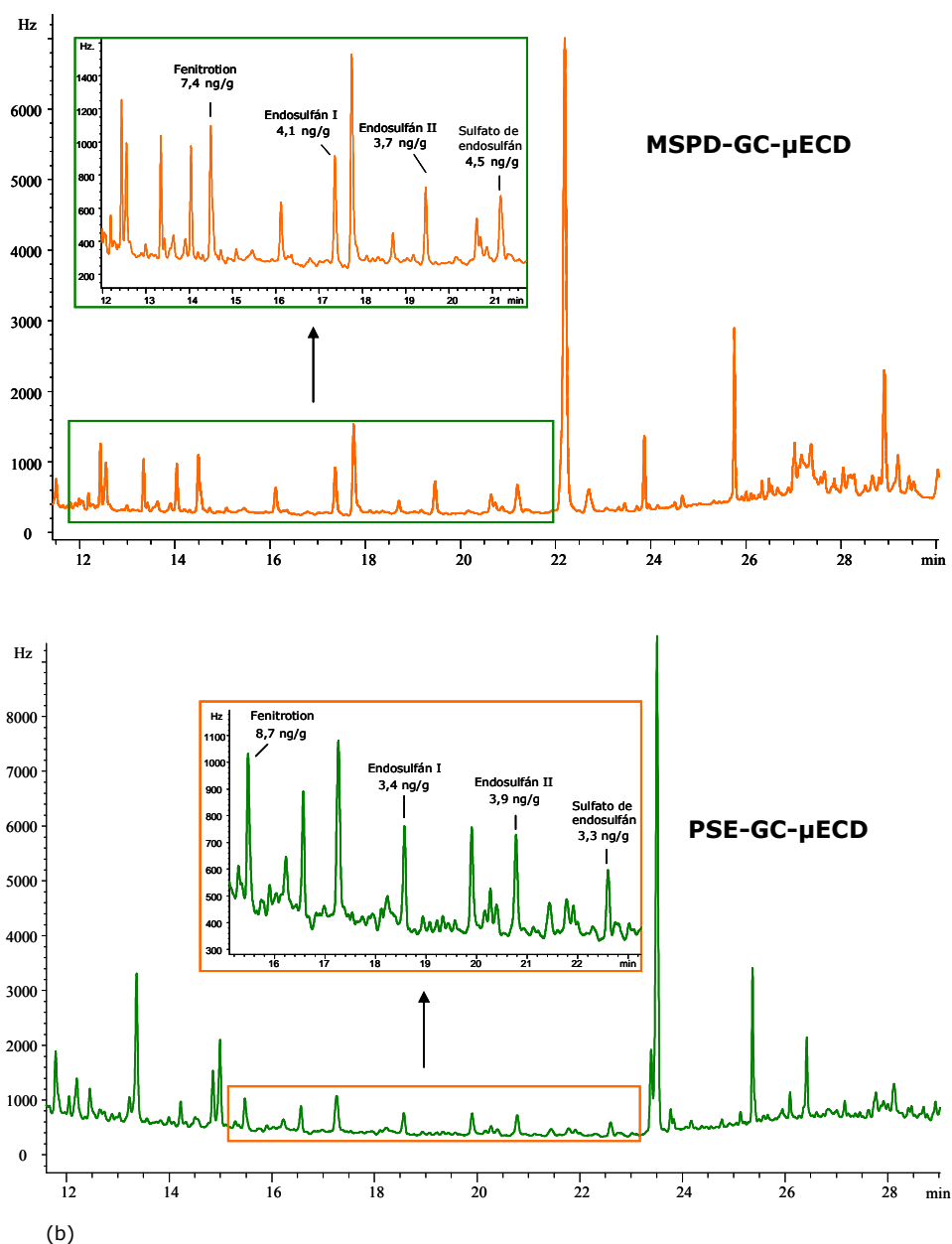


Figura IV.2.19 Cromatogramas (a) MSPD-GC-μECD y (b) PSE-GC-μECD obtenidos para la muestra de pienso J contaminada con varios pesticidas.

Por lo tanto, tanto la **dispersión de matriz en fase sólida** (MSPD) como la **extracción con disolventes presurizados** (PSE) acopladas con la detección por GC- μ ECD se han aplicado con éxito a la determinación de varios pesticidas en pienso para ganado. Con los métodos desarrollados se cumplieron los criterios más relevantes requeridos para un procedimiento de extracción como son bajo consumo de disolvente, cortos tiempos de proceso, y posibilidad de automatización (en el caso de PSE). Se emplearon estrategias de limpieza integradas con el objetivo de simplificar lo más posible la etapa de preparación de muestra y, sólo en el caso de los extractos de PSE obtenidos para muestras extremadamente complejas, se necesitó una etapa de limpieza a posteriori basada en la SPE dispersiva utilizando alúmina como adsorbente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aulakh, R.S.; Gill, J.P.S.; Bedi, J.S.; Sharma, J.K.; Joia, B.S.; Ockerman, H.W. Organochlorine pesticide residues in poultry feed, chicken muscle and eggs at a poultry farm in Punjab, India. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86, 741-744.
- [2] van der Lee, M.K.; van der Weg, G.; Traag, W.A.; Mol, H.G.J. Qualitative screening and quantitative determination of pesticides and contaminants in animal feed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1186, 325-339.
- [3] Gfrerer, M.; Chen, S.; Lankmayr, E.P.; Quan, X.; Yang, F. Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 1861-1867.
- [4] Iglesias-García, I.; Barriada-Pereira, M.; González-Castro, M.J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. Development of an analytical method based on microwave-assisted extraction and solid phase extraction cleanup for the determination of organochlorine pesticides in animal feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 745-752.
- [5] Walorczyk, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1165, 200-212.

- [6] Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Fernández, F.; Rodil, R.; Cela, R. Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1071, 93-98.
- [7] Chen, S.; Gfrerer, M.; Lankmayr, E.; Quan, X.; Yang, F. Optimization of accelerated solvent extraction for the determination of chlorinated pesticides from animal feed. *Chromatographia* **2003**, 58, 631-636.
- [8] Kristenson, E.M.; Ramos, L.; Brinkman U.A.T. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 96-111.
- [9] Silveira Dórea, H.; Mauro Lanças F. Matrix solid-phase dispersion of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in cashew nut and passion fruit. *J. Microcolumn Separations*, **1999**, 11, 367-375.
- [10] Abhilash, P.C.; Jamil, S.; Singh, N. Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1176, 43-47.
- [11] Navarro, M.; Picó, Y.; Marín, R.; Mañes, J. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* **2002**, 968, 201-209.
- [12] Garrido Frenich, A.; Plaza Bolaños, P.; Martínez Vidal, J.L. Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1153, 194-202.
- [13] Pang, G.-F.; Liu, Y.-M. ; Fan, C.-L.; Zhang, J.-J.; Cao, Y.-Z.; Li, X.-M.; Li, Z.-Y.; Wu, Y.-P. ; Guo, T.-T. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 1366-1408.
- [14] Tuinstra, L.G.M.Th.; Roos, A.H.; Griepink, B.; Maier, E.A. Certification of an animal feed reference material for the organochlorine pesticide contents: BCR CRM 115. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, 357, 1035-1041.
- [15] EPA Method 3545, Pressurised Fluid Extraction. En *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*, 3rd ed., Final Update IV; EPA SW-846; U.S. GPO, Washington, DC, **2008**.

- [16] Gfrerer, M.; Lankmayr, E. DDT degradation during enhanced solid-liquid extractions. A consideration. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1072, 117-125.
- [17] *Extraction of Chlorinated Pesticides Using Accelerated Solvent Extraction (ASE®)*, Application Note 320 (Dionex), Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, **2004**.
- [18] Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L.; Cruz Sicilia, A.D.; González Rodríguez, M.J.; Plaza Bolaños, P. Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 558, 42-52.
- [19] Obana, H.; Kikuchi, K.; Okihashi, M.; Hori, S. Determination of organophosphorus pesticides in foods using an accelerated solvent extraction system. *Analyst* **1997**, 122, 217-220.

CAPÍTULO IV.3. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN LECHE

A pesar de que la mayoría de los pesticidas **organoclorados** se han prohibido hace años todavía se pueden encontrar junto con otros fitosanitarios *modernos* en el medioambiente y en alimentos para animales, tal y como se ha comprobado en los Capítulos IV.1 y IV.2 en los que se ha comentado la detección de algunos de estos compuestos tanto en muestras de suelo como de pienso de ganado. Como resultado de su carácter lipofílico y de su resistencia a las transformaciones metabólicas, la exposición de animales productores de leche (p.ej. vacas) a los organoclorados (p.ej. a través de la ingestión de pienso o hierba contaminados) puede provocar la acumulación de residuos de estos compuestos en sus tejidos grasos. Consecuentemente, varios pesticidas organoclorados han sido detectados por otros autores en muestras de leche bovina [1, 2]. Los pesticidas **piretroides** y **organofosforados** son menos persistentes y se metabolizan con mayor facilidad que los organoclorados; sin embargo, su presencia en la leche de vaca también es posible, tal y como se ha demostrado para los organofosforados en estudios previos [3-5].

Teniendo en cuenta el lugar especial que ocupan la **leche** y sus productos derivados en la dieta humana, es importante comprobar si los niveles de residuos de pesticidas detectados en leche se mantienen por debajo de los niveles de tolerancia recomendados (**MRLs**, ver Tabla I.1.2 de la Introducción) para así minimizar los riesgos para la salud humana.

Para la extracción de pesticidas organoclorados y piretroides en leche, otros autores han recurrido a diferentes metodologías de preparación de muestra que incluyen técnicas de extracción como LLE [6-9], SPE [1, 10] y MSPD [11], en las cuales se requieren varias etapas y se generan grandes cantidades de residuos. Tanto la duración de los análisis como el consumo de disolventes orgánicos se pueden reducir empleando la microextracción en fase sólida. En el **Apartado 2.6.3** del Capítulo I ya se han mencionado las aplicaciones previas de la SPME al análisis de pesticidas (organoclorados, organofosforados y triazinas) en leche.

El **objetivo** de este estudio es el de optimizar y validar un método sensible, simple y rápido empleando **SPME-GC- μ ECD** para la determinación de más de 30 pesticidas en leche. La metodología presentada en este capítulo representa la primera aplicación de la microextracción en fase sólida a la **determinación de piretroides** en leche.

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS

Para el desarrollo y validación del método se utilizaron **leches comerciales** adquiridas en supermercados locales, de diferentes marcas y contenidos grasos. El contenido graso de estas muestras no ha sido determinado, sino que se aceptó el especificado en los envases. Así, se analizaron muestras de:

- leche **entera**, 3,5-3,6% (m/v) de grasa
- leche **semidesnatada**, 1,5-1,65% (m/v) de grasa
- leche **desnatada**, 0,3% (m/v) de grasa

Algunas de las muestras de leche manejadas fueron de **leche entera en polvo**, las cuales se disolvieron con la cantidad de agua indicada por la casa comercial para, posteriormente, ser procesadas como las muestras líquidas. Para deshacer los grumos formados al mezclar la leche en polvo con agua, la mezcla se calentó ligeramente y después se dejó enfriar.

Las muestras de leche fortificadas (0,5-100 ng mL⁻¹) se prepararon por adición de volúmenes pequeños de disoluciones de acetona conteniendo los pesticidas investigados. Realizada la adición, las muestras se homogeneizaron por agitación y se guardaron en nevera a 4 °C durante una hora, para posibilitar las interacciones analito-matriz. A continuación, las muestras se guardaron en el congelador (-20 °C) en donde permanecieron hasta 5-10 min antes de ser analizadas.

Para la validación del método se utilizó un **material de referencia certificado** (BCR-188) suministrado por la Oficina de Referencia de la Comunidad Económica Europea (*EC Community Bureau of Reference*, BCR). Este material es una muestra de leche en

polvo fortificada con un contenido certificado en hexaclorobenceno (HCB), β -lindano, γ -lindano, epóxido de heptacloro, 4,4'-DDE, dieldrina, endrina y 4,4'-DDT. Esta leche en polvo presenta, según el proveedor, un contenido en grasa en el rango 19-26% (m/m).

3.1.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN. SPME

En la Figura IV.3.1 se muestra un esquema del **procedimiento general** empleado para la extracción de pesticidas en muestras de leche mediante SPME.

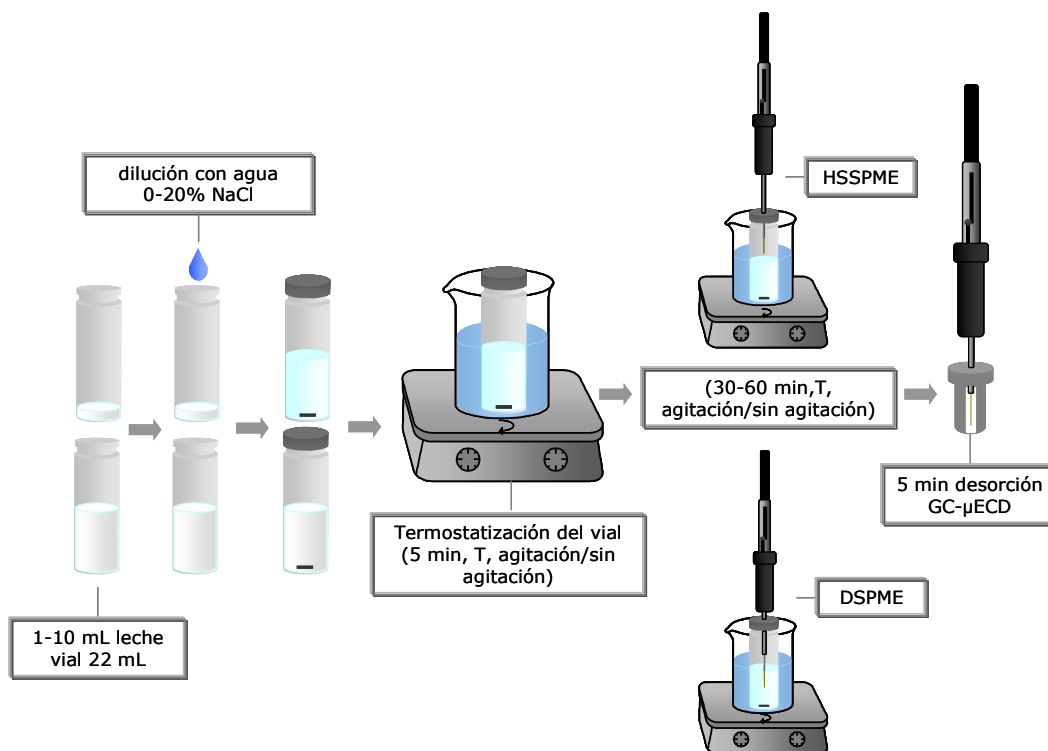


Figura IV.3.1 Esquema de extracción para la determinación de pesticidas en leche por SPME.

Las muestras de leche (10 o 1 mL, en función del experimento) se introdujeron en viales de 22 mL. Cuando se recurrió a la dilución de las muestras, se añadió al vial el correspondiente volumen de agua ultrapura. Del mismo modo, se añadió un 20% (m/v) de NaCl en los experimentos requeridos. Después de introducir (en los casos necesarios) los clavos de acero utilizados para la agitación de las muestras, los viales se cerraron con septa con la cara interior recubierta de Teflón y con cápsulas de

aluminio. Posteriormente, los viales se introdujeron en un baño de agua a la temperatura de trabajo y se termostataron durante 5 min. Transcurrido este tiempo, la fibra de SPME se expuso al espacio de cabeza sobre la muestra (HSSPME), o se sumergió directamente en la misma (DSPME) durante 30 o 60 min, dependiendo del experimento. En algunas extracciones, las muestras se agitaron magnéticamente durante la SPME. Terminada la extracción, se retiró la fibra de los viales y se insertó en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, procediéndose a la separación y cuantificación de los analitos investigados. El tiempo de desorción fue de 5 min.

Cuando se extraen por inmersión directa (DSPME) muestras a las que previamente se les ha adicionado NaCl, es importante limpiar la fibra antes de desorberla en el inyector. Para ello, en estos casos, la fibra se sumergió tres veces durante un instante en un vial con agua ultrapura. Procediendo de esta manera se prolonga la vida de la fibra, evitando el deterioro causado por la presencia de NaCl, y se protege el equipo cromatográfico.

3.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES

Tanto el modelo del equipo utilizado para el análisis de los pesticidas investigados (GC- μ ECD), como las condiciones instrumentales manejadas coincidieron con los empleados en la **Determinación de pesticidas en suelo (Apartado 1.1.3, Capítulo IV.1)**.

Obviamente, dado que las condiciones cromatográficas fueron las mismas que en los estudios en suelo, el orden de elución de los analitos y los *clústers* observados para algunos de los piretroides no cambiaron con respecto a dicho trabajo. En cuanto a los tiempos de retención, prácticamente coinciden con los indicados en la **Tabla IV.1.3 (Capítulo IV.1)**. Las pequeñas variaciones observadas se deben a que se trabajó en dos equipos diferentes (pero del mismo modelo) y/o a los procedimientos habituales requeridos durante el mantenimiento de la columna cromatográfica.

3.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.2.1 EXPERIMENTOS PREVIOS DE SPME

3.2.1.1 Influencia del modo de muestreo y de la relación de dilución

Debido a la complejidad y al carácter lipofílico de la matriz estudiada, las primeras pruebas de SPME se realizaron muestreando el espacio de cabeza (**HSSPME**) con el objetivo de evitar el deterioro y la contaminación de la fase de la fibra y del equipo cromatográfico. En estos experimentos, se extrajeron 10 mL de una muestra de leche entera (fortificada con 25 ng mL⁻¹ de cada pesticida) a 100 °C, durante 30 min y utilizando una fibra de PDMS-DVB.

Además, se estudió el **efecto de la dilución** de las muestras de leche mediante la extracción (bajo las mismas condiciones) de alícuotas de 1 mL de leche (en lugar de 10 mL) diluidas hasta 10 mL con agua ultrapura. Inicialmente, se esperaba que la dilución de las muestras supusiera una reducción en la sensibilidad del método; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las respuestas analíticas obtenidas en ambos experimentos (ver Figura IV.3.2). Estos resultados se podrían justificar teniendo en cuenta que la dilución de la muestra de leche implica una menor concentración (10 veces inferior) de los analitos en la muestra analizada pero, al mismo tiempo, en la muestra diluida el efecto matriz es menor lo que favorece la transferencia de los analitos de la muestra a la fibra. No obstante, es importante destacar que trabajando con este modo de muestreo (HSSPME) la cantidad extraída de la mayoría de los piretroides fue muy baja; de hecho, alguno de ellos (ver ciflutrina y deltametrina en la Figura IV.3.2) no fueron detectados en estos experimentos preliminares.

La reducción del efecto matriz derivada de la extracción de **muestras de leche diluidas con agua** permitió el muestro por inmersión directa de la fibra. Por tanto, se realizaron una serie de experimentos en los que se extrajeron por inmersión directa (**DSPME**) muestras de leche diluidas (1:10). Los resultados obtenidos para algunos de los pesticidas investigados también se han incluido en la Figura IV.3.2. Bajo estas condiciones, todos los analitos se pudieron extraer incluidos los piretroides (ver

ciflutrina y deltametrina en la Figura IV.3.2). Tan sólo en el caso de la teflutrina, el heptacloro y la aldrina (ver estos dos últimos compuestos en la Figura IV.3.2) se observó un descenso importante en la señal al comparar los resultados con los obtenidos en los experimentos de HSSPME. Además, mediante DSPME se consiguió un importante incremento en la respuesta para muchos pesticidas como por ejemplo la endrina y el 4,4'-DDT (Figura IV.3.2).

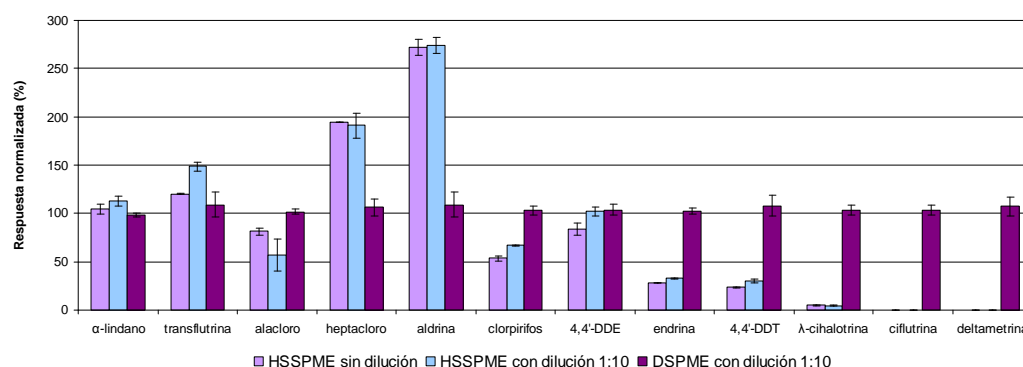


Figura IV.3.2 Influencia del modo de muestreo y de la dilución de la muestra en la SPME de algunos de los pesticidas objetivo en muestras de leche. Las respuestas están normalizadas a las obtenidas en los experimentos de DSPME con dilución 1:10.

El siguiente paso consistió en estudiar **diferentes ratios de dilución** de las muestras de leche. Así, se realizaron una serie de experimentos extrayendo mediante DSPME muestras de leche diluidas con agua ultrapura con las siguientes relaciones de dilución: 1:20, 1:10 y 1:5. Los resultados obtenidos para algunos de los pesticidas investigados se muestran en la Figura IV.3.3.

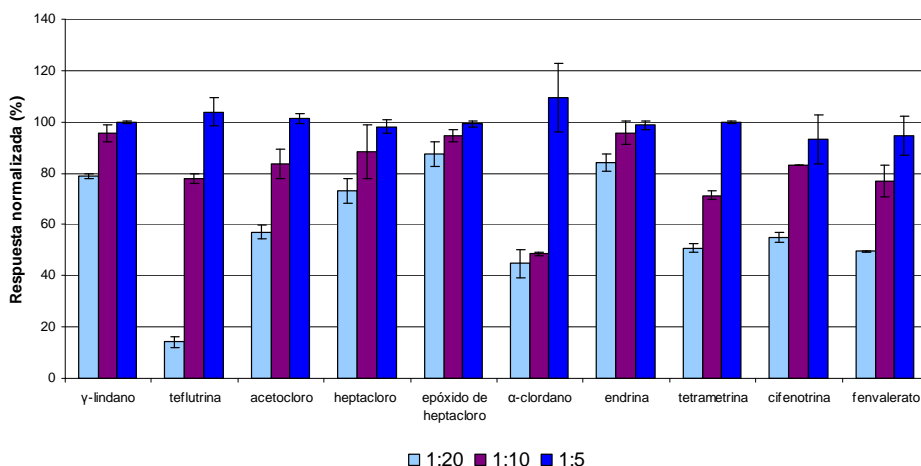


Figura IV.3.3 Influencia de la relación de dilución en la DSPME de algunos analitos seleccionados. Las respuestas están normalizadas a las obtenidas para una dilución 1:5.

Se observó que, en general, las respuestas fueron ligeramente mayores al trabajar con la menor dilución (1:5). No obstante, este incremento de sensibilidad conseguido con una dilución 1:5 no fue demasiado significativo si se compara con los resultados obtenidos con una dilución 1:10. Tan solo en el caso del α -clordano se apreció un incremento notable de la señal al trabajar con una relación de dilución 1:5; sin embargo, trabajando con una dilución 1:10 se consiguió una relación S/N para este pesticida suficiente (teniendo en cuenta el MRL de este compuesto en leche, ver **Tabla I.1.2** de la Introducción). Por otro lado, se observó una mejora significativa en la eficacia de la extracción para el alacloro y la teflutrina (ver este último en la Figura IV.3.3) al trabajar con una dilución 1:10 en lugar de 1:20. Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados y considerando que factores de dilución inferiores pueden reducir el tiempo de vida de las fibras de SPME e incrementar los artefactos cromatográficos, en los experimentos sucesivos se trabajó diluyendo 1 mL de leche con 9 mL de agua ultrapura (**ratio de dilución 1:10**).

3.2.1.2 Influencia del volumen de acetona

Tal y como se ha explicado en la Introducción (**Apartado 2.5.6, Capítulo I.2**), la presencia de porcentajes elevados de disolventes orgánicos en agua pueden modificar la constante de distribución entre la fibra y la muestra. Dado que las muestras de

leche se fortificaron adicionando diferentes volúmenes de disoluciones de los analitos en acetona, se consideró necesario demostrar que el **volumen de acetona** no es un factor significativo que pudiera afectar a la extracción de los pesticidas investigados.

Con este fin, se extrajeron alícuotas de 1 mL de una muestra de leche entera fortificada (10 ng mL^{-1}). Por un lado se analizó una alícuota sin adición de una cantidad de acetona extra y, por otro, se analizó otra alícuota a la que se le adicionaron 100 μL extra de acetona. En la Figura IV.3.4 se representan los resultados obtenidos en estos experimentos para algunos de los analitos. Se obtuvieron los mismos resultados independientemente de si se adicionó o no un volumen extra de acetona, puesto que las pequeñas diferencias apreciadas entre las respuestas obtenidas en ambos experimentos fueron atribuidas al error experimental.

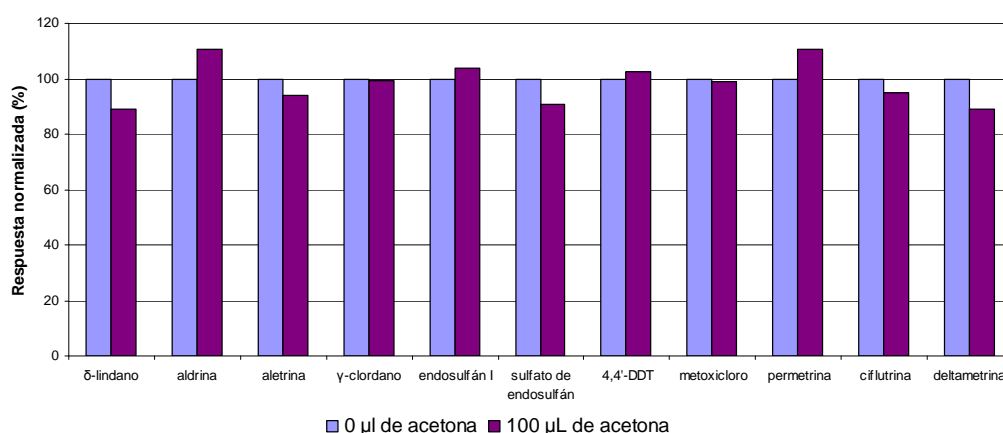


Figura IV.3.4 Influencia del volumen de acetona para algunos de los pesticidas estudiados. Las respuestas están normalizadas a las obtenidas para las muestras de leche sin adición de un volumen extra de acetona.

3.2.1.3 Influencia del tiempo de extracción

Para investigar el efecto del **tiempo de extracción** se realizaron una serie de experimentos en los que se sumergió la fibra en una muestra de leche entera (10 ng mL^{-1}) diluida durante 30 y 60 min. Los resultados obtenidos (mostrados en la Figura IV.3.5 para algunos analitos seleccionados) permitieron concluir que el muestreo durante 60 min no supone una mejoría perceptible de los resultados, si éstos se comparan con los obtenidos para 30 min de extracción.

No se evaluaron tiempos de extracción inferiores puesto que la duración del programa cromatográfico es de 34 min y, por lo tanto, la posible reducción en el tiempo de extracción no implicaría una disminución de la duración total del análisis. De manera que se eligió **30 min** como el tiempo de extracción óptimo.

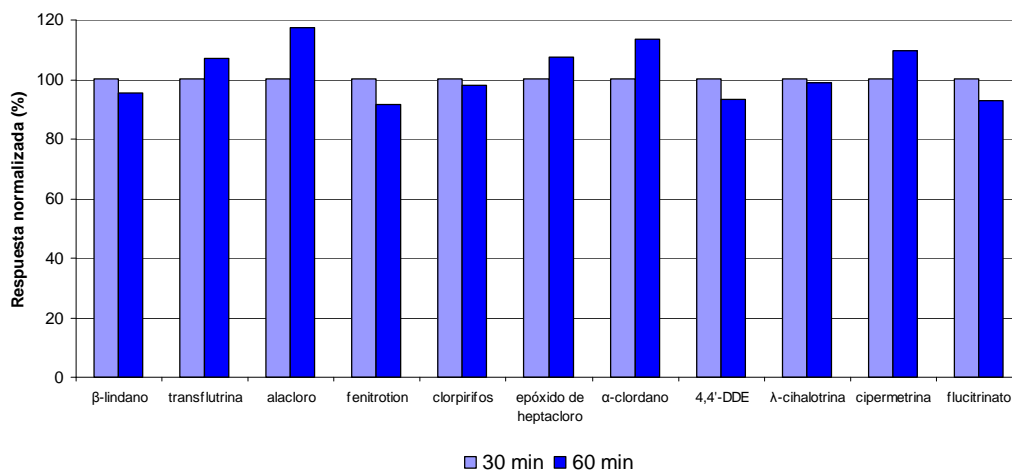


Figura IV.3.5 Influencia del tiempo de extracción para algunos pesticidas seleccionados. Las respuestas están normalizadas con respecto a las obtenidas para 30 min.

3.2.1.4 Influencia del recubrimiento de la fibra

Se realizaron una serie de experimentos a fin de elegir qué niveles del factor **fibra** se deberían incluir en el diseño experimental planteado para la optimización del método (**Apartado 3.2.2**). Estos experimentos se realizaron utilizando alícuotas de una muestra de leche entera fortificada a un nivel de 10 ng mL⁻¹. Los resultados obtenidos con las diferentes fibras se han representado en la Figura IV.3.6.

En general, para los compuestos más volátiles (1-27) se obtuvieron mejores resultados con las fibras PDMS-DVB y CAR-PDMS, mientras que PDMS fue la fibra menos eficaz. En lo que respecta a los piretroides menos volátiles (28-35), con las fibras PDMS, PDMS-DVB, CAR-PDMS y PA se obtuvieron respuestas similares, mientras que con CW-DVB los resultados fueron mucho peores. Por tanto, se concluyó que PDMS-DVB y CAR-PDMS son los recubrimientos más apropiados para el análisis simultáneo de los pesticidas investigados, dado que con ambas fibras se pudieron

extraer eficientemente todos los analitos. De manera que las fibras de **PDMS-DVB** y **CAR-PDMS** fueron las seleccionadas para ser incluidas en el diseño experimental.

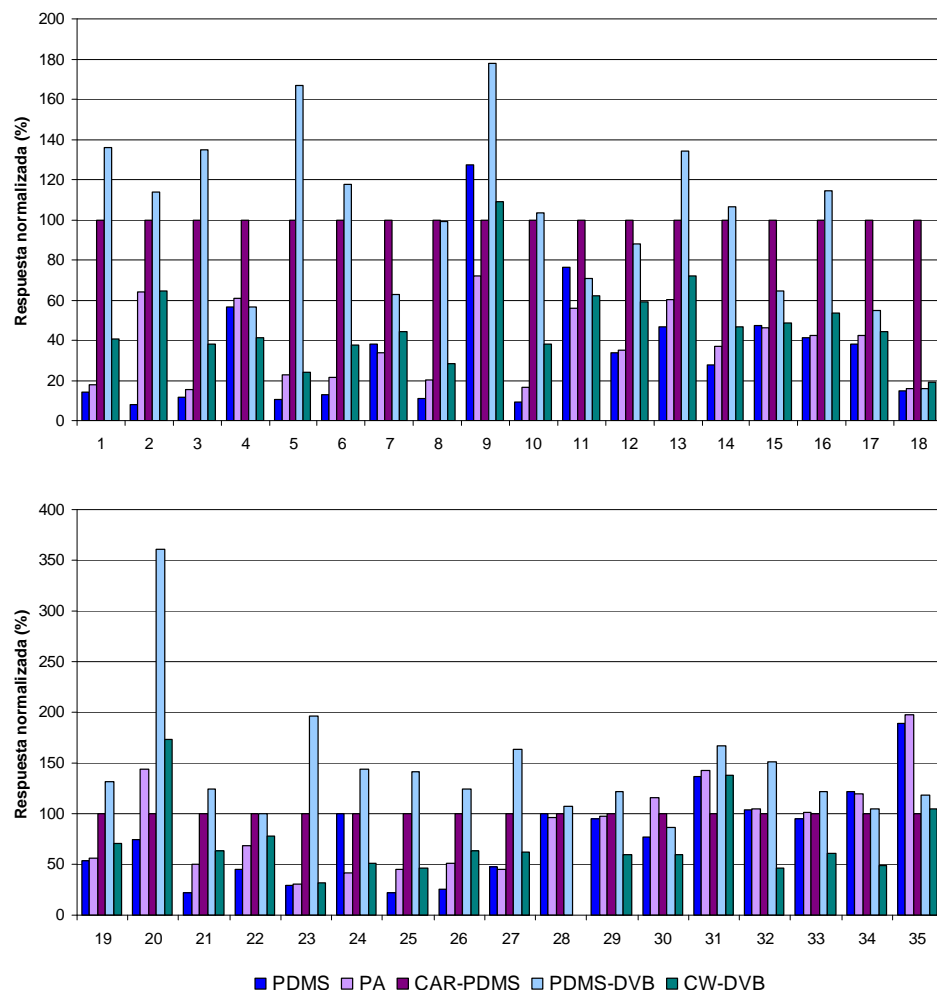


Figura IV.3.6 Influencia del recubrimiento de la fibra en la extracción de los pesticidas estudiados. Las respuestas están normalizadas con respecto a las obtenidas con la fibra CAR-PDMS: (1) α -lindano, (2) β -lindano, (3) γ -lindano, (4) teflutrina, (5) δ -lindano, (6) acetocloro, (7) transflutrina, (8) alacloro, (9) heptacloro, (10) fenitrotrion, (11) aldrina, (12) clorpirifos, (13) epóxido de heptacloro, (14) aletrina, (15) γ -clordano, (16) endosulfán I, (17) α -clordano, (18) 4,4'-DDE, (19) dieldrina, (20) endrina, (21) endosulfán II, (22) 4,4'-DDD, (23) sulfato de endosulfán, (24) 4,4'-DDT, (25) cetona de endrina, (26) tetrametrina, (27) metoxicloro, (28) λ -cihalotrina, (29) cifenotrina, (30) permetrina, (31) ciflutrina, (32) cipermetrina, (33) flucitrinato, (34) fenvalerato, (35) deltametrina.

3.2.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SPME: DISEÑO FACTORIAL

Se planteó un **diseño experimental** con el objetivo de estudiar la influencia de varios factores en el proceso de SPME y de encontrar las condiciones experimentales óptimas. Sobre la base de los experimentos preliminares, se mantuvieron fijas algunas de las condiciones experimentales (factor de dilución y tiempo de extracción) y se seleccionaron 5 variables para definir el dominio experimental: recubrimiento de fibra (A), modo de muestreo (B), agitación (C), temperatura de extracción (D) y adición de NaCl (E). Todos los factores se estudiaron a dos niveles (ver Tabla IV.3.1).

Tabla IV.3.1 Factores y niveles evaluados mediante el diseño experimental.

Factor	Código	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)	Continuo
Recubrimiento de fibra	A	CAR-PDMS	PDMS-DVB	No
Modo de muestreo	B	DSPME	HSSPME	No
Agitación	C	No	Sí	No
Temperatura de extracción (°C)	D	50	100	Si
NaCl (% m/v)	E	0	20	Si

Se descartó la posibilidad de realizar un diseño factorial completo (2^5), puesto que éste requeriría la realización de un elevado número de experiencias (32). En su lugar se planteó un **diseño factorial fraccionado (2^{5-1})**. A pesar de que la reducción del número de experiencias (de 32 a 16) implica una pérdida de información, el diseño planteado es de **resolución V**, lo que significa que los efectos principales sólo están confundidos con las interacciones de cuarto orden o superior, y que las interacciones de segundo orden no se confunden entre sí aunque sí con las de tercer orden. Por lo tanto, con el diseño planteado se pudieron estimar tanto los efectos principales como las interacciones de segundo orden, asumiendo que las interacciones de tercer orden y superior no fueron significativas. Todos los experimentos se realizaron con alícuotas de una muestra de leche entera fortificada con 25 ng mL^{-1} de cada pesticida estudiado. Además, en todos los casos se utilizó un factor de dilución de 10 y se muestreó durante 30 min (tal y como se ha justificado en el **Apartado 3.2.1**).

Se utilizó el programa informático Statgraphics-Plus para la obtención de la **matriz de experimentos** (ver Tabla IV.3.2), así como para la interpretación de los resultados

generados tras introducir en dicho programa los datos obtenidos en los 16 experimentos.

Tabla IV.3.2 Matriz de experiencias del diseño factorial fraccionado (2^{5-1}).

Experiencia	Recubrimiento de fibra	Modo de muestreo	Agitación	Temperatura de extracción (°C)	NaCl (% m/v)
1	CAR-PDMS	HSSPME	Sí	100	0
2	CAR-PDMS	DSPME	No	100	0
3	CAR-PDMS	DSPME	Sí	100	20
4	CAR-PDMS	HSSPME	No	100	20
5	CAR-PDMS	DSPME	No	50	20
6	CAR-PDMS	HSSPME	No	50	0
7	CAR-PDMS	DSPME	Sí	50	0
8	CAR-PDMS	HSSPME	Sí	50	20
9	PDMS-DVB	HSSPME	No	100	0
10	PDMS-DVB	DSPME	Sí	100	0
11	PDMS-DVB	HSSPME	Sí	100	20
12	PDMS-DVB	DSPME	No	100	20
13	PDMS-DVB	DSPME	No	50	0
14	PDMS-DVB	HSSPME	No	50	20
15	PDMS-DVB	DSPME	Sí	50	20
16	PDMS-DVB	HSSPME	Sí	50	0

Así, el programa Statgraphics-Plus proporcionó, entre otras gráficas, las cartas Pareto, los gráficos de efectos principales y los gráficos de interacciones. Estas gráficas se discuten con detalle en las siguientes secciones.

3.2.2.1 Cartas Pareto y gráficos de efectos principales

Para una mayor simplicidad en la representación de los resultados obtenidos, en las Figuras IV.3.7 y IV.3.8 sólo se muestran las cartas Pareto y los gráficos de efectos principales obtenidos para algunos de los pesticidas estudiados, pero que se consideran representativos del comportamiento general de todos los analitos.

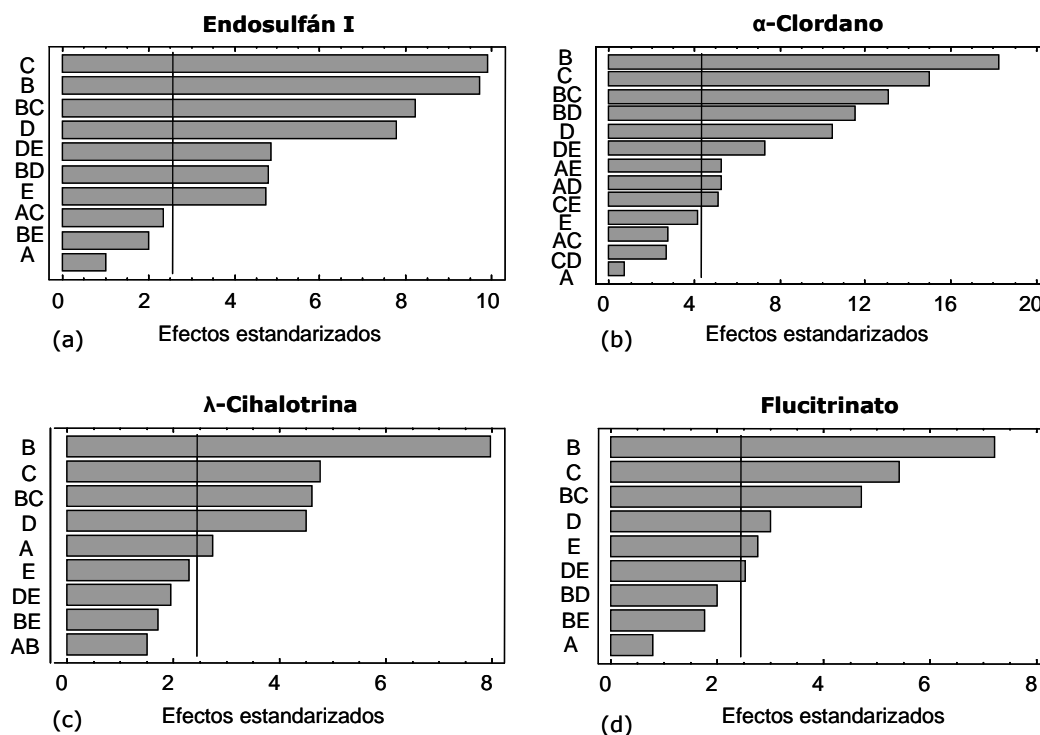


Figura IV.3.7 Cartas Pareto para algunos pesticidas seleccionados: (a) endosulfán I; (b) α -clordano; (c) λ -cihalotrina; (d) flucitrinato.

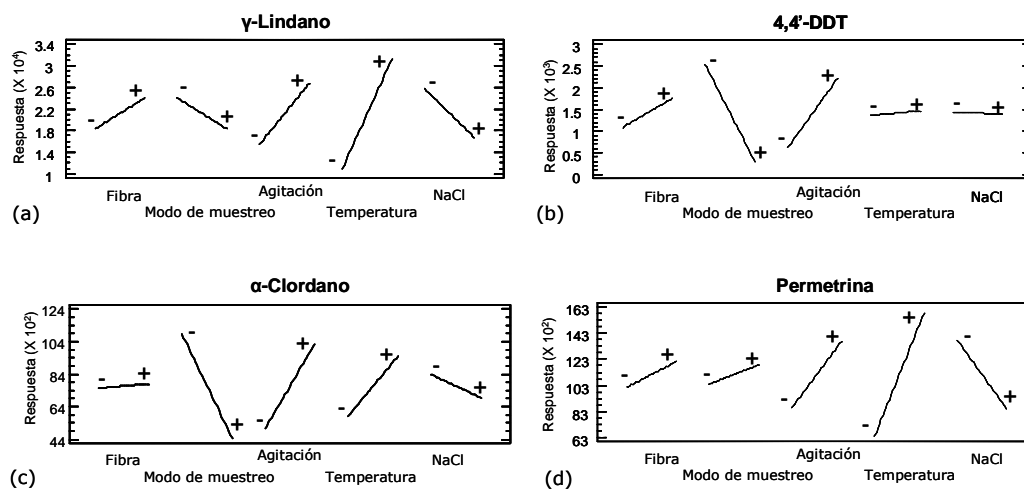


Figura IV.3.8 Gráficos de efectos principales para algunos pesticidas seleccionados: (a) γ -lindano; (b) 4,4'-DDT; (c) α -clordano; (d) permetrina.

Como ya se ha explicado en los capítulos anteriores, de las **cartas Pareto** (Figura IV.3.7) se puede deducir qué efectos principales o interacciones tienen una influencia estadísticamente significativa (a un nivel de confianza del 95%) en la respuesta de los pesticidas investigados. Por otro lado, a partir de los **gráficos de efectos principales** (Figura IV.3.8) se extrae cuál es el nivel de cada factor que produce las respuestas más altas.

Según se deduce de ambas gráficas, el **modo de muestreo** (B) fue una de las variables más importantes (ver Figura IV.3.7), con una pendiente negativa en los gráficos de efectos principales (Figura IV.3.8), indicando que el muestreo directo (**DSPME**) es el más favorable, incluso para los analitos más volátiles. Sólo en el caso de α -lindano, aldrina, teflutrina y permetrina (ver éste último en la Figura IV.3.8) el muestreo en espacio de cabeza (HSSPME) condujo a respuestas cromatográficas mayores. Sin embargo, para estos compuestos el modo de muestreo no fue una variable significativa.

De las cartas Pareto y de los gráficos de efectos principales (Figuras IV.3.7 y IV.3.8) se concluyó que la **agitación** (C) tiene una influencia positiva en la eficacia de la extracción y que, además, es una variable estadísticamente significativa para todos los pesticidas investigados.

En la SPME, la optimización de la temperatura de extracción es muy importante dado que es un parámetro que afecta tanto a la termodinámica como a la cinética de la extracción (**Apartado 2.5.3, Capítulo 1.2**). Para la mayoría de los analitos (excepto para el 4,4'-DDD, sulfato de endosulfán, 4,4'-DDT y metoxicloro), la **temperatura** (D) fue una variable significativa (ver Figura IV.3.7) y, en general, se obtuvieron mayores áreas de pico cuando se trabajó a 100 °C (Figura IV.3.8).

En lo que respecta a la **adición de sal**, éste fue un factor significativo para 20 pesticidas (ver algunos ejemplos en la Figura IV.3.7). De la interpretación de los gráficos de efectos principales (Figura IV.3.8) se dedujo que el efecto salino no supone una mejora de la eficacia de la extracción para ninguno de los analitos y que, en muchos casos, la respuesta fue incluso significativamente inferior al añadir sal. Por tanto, se concluyó que la adición de NaCl no favorece la extracción de los pesticidas

estudiados en leche. Este efecto negativo de la adición de sal también fue observado por otros autores en estudios anteriores en los que se extrajeron pesticidas de otras matrices como agua o aceite [12, 13]. Este comportamiento se podría probablemente atribuir a la influencia negativa de la sal en la cinética del proceso de SPME [14] como consecuencia del incremento de la viscosidad y la densidad de la muestra.

Finalmente, el **recubrimiento de la fibra (A)** sólo fue significativo para diez de los pesticidas estudiados (β -, γ - y δ -lindano, heptacloro, endrina, acetocloro, alacloro, transflutrina, aletrina y λ -cihalotrina). En todos estos casos, las mejores recuperaciones se consiguieron al utilizar la fibra PDMS-DVB.

2.2.2.2 Gráficos de interacciones

Según se dedujo de las cartas Pareto, algunas interacciones (BC, DE y BD) fueron estadísticamente significativas para la mayoría de los pesticidas estudiados (ver Figura IV.3.7). En la Figura IV.3.9 se muestran los gráficos de estas interacciones para cuatro de los analitos estudiados.

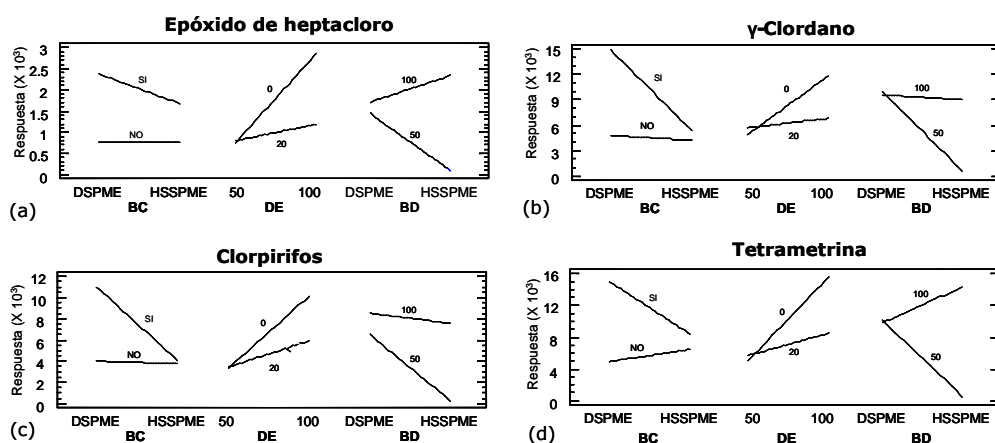


Figura IV.3.9 Gráficos de interacción para algunos pesticidas seleccionados: (a) epóxido de heptacloro; (b) γ -clordano; (c) clorpirifos; (d) tetrametrina.

En primer lugar, la **interacción modo de muestreo-agitación** (BC) fue importante para un elevado número de los compuestos investigados. Tal y como se puede observar en la Figura IV.3.9, utilizando DSPME se observó un incremento significativo de la respuesta cuando la muestra se agitó, mientras que al trabajar en HSSPME el efecto de la agitación fue despreciable en la mayoría de los casos. Esta interacción puede estar relacionada con la cinética de la DSPME, ya que, para este modo de muestreo, la etapa limitante es la difusión de los compuestos en la disolución y agitando se acelera dicha difusión.

La **interacción entre la temperatura y la adición de NaCl** (DE) también fue significativa para varios compuestos (Figura IV.3.9). Para la mayoría de ellos, al trabajar a 50 °C se observaron diferencias muy pequeñas entre adicionar un 0 o un 20% de sal (sólo en el caso de la endrina y el metoxicloro la adición de sal a esta temperatura tuvo un efecto positivo importante). Sin embargo, a 100 °C, estas diferencias sí que fueron importantes y se obtuvieron mejores resultados cuando no se adicionó sal.

En la Figura IV.3.9 también se representa la **interacción entre el modo de muestreo y la temperatura** (BD) para algunos analitos. De los gráficos de interacción mostrados se deduce que la influencia de la temperatura es mucho mayor para HSSPME que para DSPME. Esta interacción ya había sido observada por otros autores en estudios previos relacionados con la SPME de diferentes grupos de analitos [15-17].

En la Tabla IV.3.3 se resumen las **condiciones óptimas** para la extracción de los pesticidas investigados. Se han resaltado aquellos factores que fueron significativos y, además, en las últimas columnas se han incluido los efectos de interacción significativos.

Tabla IV.3.3 Condiciones experimentales óptimas e interacciones significativas para cada compuesto dadas por el diseño factorial fraccional 2^{5-1} . Los factores significativos se han resaltado en negrita, mientras que con un asterisco se han señalado las interacciones significativas.

Pesticida	Fibra	Modo de muestreo	Agitación	Temperatura (°C)	NaCl (% m/v)	BC	BD	DE
α -Lindano	PDMS-DVB	HSSPME	SÍ	100	0		*	*
β -Lindano	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*	*	*
γ -Lindano	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*	*	*
Teflutrina	CAR-PDMS	HSSPME	SÍ	100	0		*	*
δ -Lindano	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
Acetocloro	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0		*	
Transflutrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
Alacloro	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0		*	
Heptacloro	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
Fenitrotrion	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
Aldrina	PDMS-DVB	HSSPME	NO	100	0	*	*	*
Clorpirifos	CAR-PDMS	DSPME	SÍ	100	0	*	*	*
Epóxido de heptacloro	CAR-PDMS	HSSPME	SÍ	100	0		*	*
Aletrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0		*	
γ -Clordano	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	50	20	*	*	*
Endosulfán I	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*	*	*
α -Clordano	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	50	20	*	*	*
4,4'-DDE	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	50	20	*	*	*
Dieldrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	50	20	*	*	*
Endrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*	*	*
Endosulfán II	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		*
4,4'-DDD	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	50	20	*		
Sulfato de endosulfán	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
4,4'-DDT	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	50	20	*		
Cetona de endrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
Tetrametrina	CAR-PDMS	HSSPME	SÍ	100	0	*	*	*
Metoxicloro	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		*
λ -Cihalotrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
Cifentrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		
Permetrina	PDMS-DVB	HSSPME	NO	100	0	*	*	*
Ciflutrina	CAR-PDMS	DSPME	SÍ	100	0	*	*	*
Cipermetrina	CAR-PDMS	HSSPME	SÍ	100	0		*	*
Flucitrinato	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*		*
Fenvalerato	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	50	20	*	*	*
Deltametrina	PDMS-DVB	DSPME	SÍ	100	0	*	*	

Para finalizar la discusión de las interacciones, es importante resaltar que en algunos casos (aldrina, epóxido de heptacloro, γ -clordano, α -clordano, 4,4'-DDE, dieldrina, tetrametrina, permetrina, cipermetrina, fenvalerato), algunas de las interacciones fueron hasta tal punto importantes que su efecto pudo modificar las condiciones óptimas seleccionadas sobre la base de la interpretación de los gráficos de efectos principales. Por ejemplo, las interacciones BC, BD, y DE tuvieron una gran influencia en la respuesta del α -clordano (ver carta Pareto en la Figura IV.3.7). Ésta es la razón por la que 50 °C y 20% NaCl fueron los niveles óptimos de los factores temperatura y adición de sal, respectivamente, a pesar de que pareciera que 100 °C y 0% NaCl eran

las condiciones más favorables de acuerdo con la interpretación de los gráficos de efectos principales (Figura IV.3.8).

Después de la optimización de las variables consideradas, se recomendó un **procedimiento definitivo** para la extracción simultánea de los 35 pesticidas investigados en leche. En la Tabla IV.3.4 se recogen los niveles propuestos para cada uno de los factores evaluados mediante el diseño experimental, así como los parámetros que se han mantenido constantes durante estos experimentos.

Tabla IV.3.4 Niveles óptimos de los factores estudiados y variables fijas.

Factores estudiados	Óptimo
Recubrimiento de fibra	PDMS-DVB
Modo de muestreo	DSPME
Agitación	Sí
Temperatura de extracción (°C)	100
NaCl (% m/v)	0
Factores fijos	
Tamaño de muestra (mL)	1
Relación de dilución	1:10
Volumen de vial (mL)	22
Tiempo de exposición (min)	30

En la Figura IV.3.10 se muestra el cromatograma obtenido para la inyección en el GC- μ ECD de una DSSPME, bajo las condiciones recomendadas, correspondiente a una muestra de leche entera con adición de 10 ng mL⁻¹ de los pesticidas investigados.

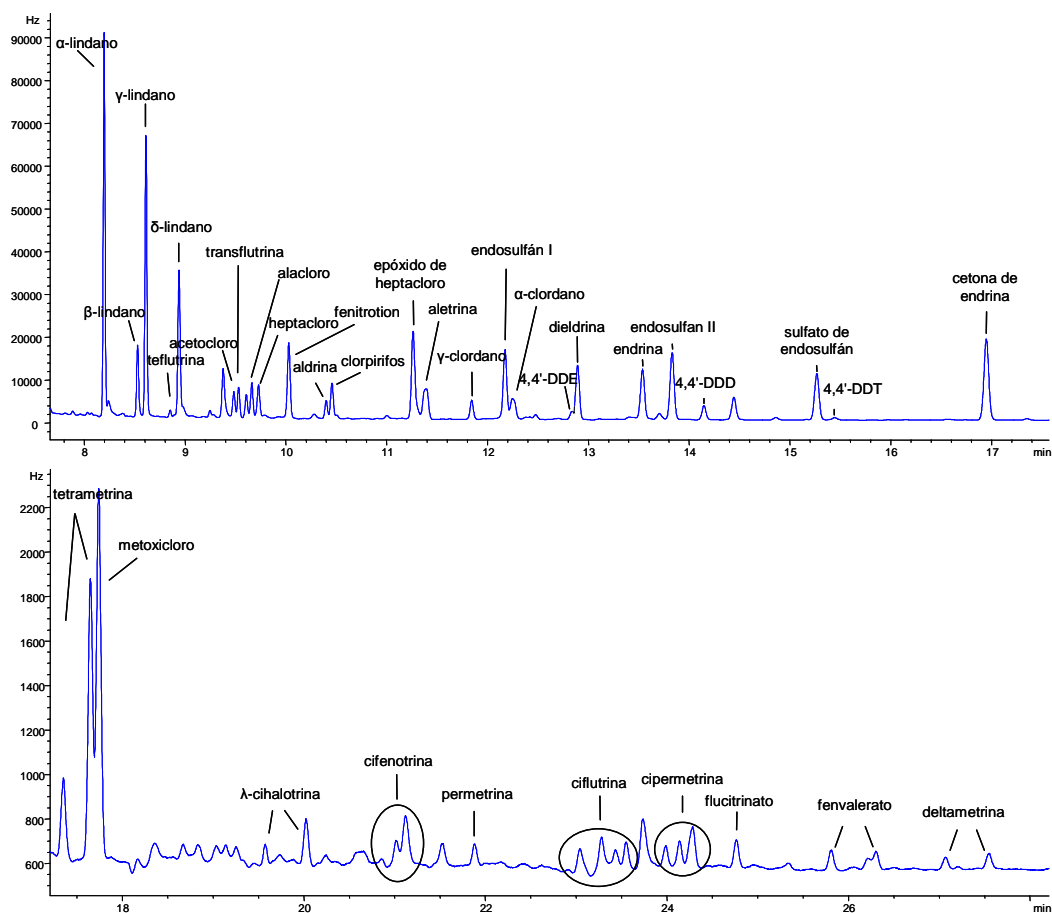


Figura IV.3.10 Cromatograma DSPME-GC- μ ECD de una muestra de leche entera (con adición de 10 ng mL^{-1} de los pesticidas) obtenido siguiendo el método propuesto.

3.2.3 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD DEL MÉTODO

Con el propósito de evaluar los **parámetros de calidad del método** se analizaron muestras de leche entera con adición de concentraciones conocidas de los pesticidas investigados.

En primer lugar, para estimar la **repetibilidad** del método se realizaron series de 3 análisis consecutivos de muestras de leche fortificadas a dos niveles de concentración (2 y 10 ng mL^{-1}). También se evaluó la variabilidad entre días, o **reproducibilidad**, a partir del análisis de cuatro réplicas (al nivel de 10 ng mL^{-1}) en días diferentes. Los resultados obtenidos, expresados como desviación estándar relativa (RSD), se han

incluido en la Tabla IV.3.5. En cuanto a la repetibilidad, los valores de RSD están comprendidos entre el 2,1 y el 18%, con un valor medio del 13%. En lo que respecta a la reproducibilidad, los valores de RSD caen prácticamente en el mismo rango (2,0-21%), con una media del 14%.

El estudio de calibración realizado para evaluar la **linealidad** del método propuesto se llevó a cabo sobre muestras de leche entera fortificadas a 6 niveles de concentración comprendidos entre 0,5 y 100 ng mL⁻¹ (2-100 ng mL⁻¹ para la λ -cihalotrina, cifenotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina, flucitrinato, fenvalerato y deltametrina) y siguiendo el procedimiento de dilución 1:10 con agua ultrapura indicado anteriormente. Cada uno de los niveles evaluados se analizó por duplicado o triplicado. El método exhibió una buena linealidad para todos los analitos en el rango de concentraciones examinado, con coeficientes de correlación (R) comprendidos entre 0,9901 y 0,9999 (Tabla IV.3.5).

Los **límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs)** del método se calcularon de nuevo como la concentración a la que le corresponde una señal analítica de 3 y 10 veces la señal del ruido, respectivamente. Los LODs son inferiores al ng mL⁻¹ y tanto los LODs como los LOQs están por debajo de los límites establecidos por la Unión Europea (Tabla IV.3.5 y Tabla I.1.2 de la Introducción). En la Tabla IV.3.5 también se han incluido los LOQs expresados en ng g⁻¹, para así poder comparar directamente estos valores con los MRLs en leche (dados por la EU en ng g⁻¹). Para realizar este cambio de unidades se tuvo en cuenta la densidad de la leche entera (1,032 g mL⁻¹), así como el porcentaje de materia seca no grasa (8,5%) y el contenido graso (3,7%); valores estos resultado de las medias obtenidas de los análisis de cientos de muestras de leche en el 2006 [datos internos del LIGAL].

Además, estos límites mejoran sustancialmente para muestras de leche semidesnatada y desnatada, dado que el método propuesto es más sensible para muestras de leche con un contenido bajo de grasa, tal y como se verá en el siguiente apartado.

Tabla IV.3.5 Precisión, linealidad y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del método propuesto.

Pesticida	Precisión (RSD, %)			R	LOQ ng mL ⁻¹	LOD ng mL ⁻¹	LOQ ng g ⁻¹
	Repetibilidad (n=3)		Reproducibilidad (n=4 d)				
	2 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹				
α-Lindano	11	5,8	3,4	0,9940	0,060	0,018	0,49
β-Lindano	4,4	2,9	2,2	0,9983	0,043	0,013	0,35
γ-Lindano	9,0	4,3	3,8	0,9960	0,010	0,003	0,08
Teflutrina	7,0	5,5	9,9	0,9958	0,17	0,050	1,4
δ-Lindano	4,8	12	14	0,9962	0,040	0,012	0,33
Acetocloro	6,0	8,9	5,0	0,9979	0,13	0,038	1,0
Transflutrina	10	15	6,0	0,9983	0,13	0,038	1,0
Alacloro	4,0	1,7	3,2	0,9901	0,13	0,039	1,1
Heptacloro	15	16	9,8	0,9982	0,083	0,025	0,68
Fenitroton	2,1	8,3	7,3	0,9968	0,040	0,012	0,33
Aldrina	14	11	6,4	0,9997	0,13	0,038	1,0
Clorpirifos	4,2	5,9	2,0	0,9992	0,13	0,038	1,0
Epóxido de heptacloro	17	9,8	8,4	0,9992	0,051	0,015	0,42
Aletrina	10	8,5	10	0,9994	0,089	0,027	0,73
γ-Clordano	17	8,9	5,6	0,9992	0,090	0,027	0,73
Endosulfán I	4,9	8,8	4,1	0,9986	0,10	0,030	0,82
α-Clordano	13	14	20	0,9954	0,21	0,063	1,7
4,4'-DDE	10	3,2	9,3	0,9976	0,20	0,060	1,6
Dieldrina	16	11	6,7	0,9993	0,050	0,015	0,41
Endrina	7,1	9,8	3,6	0,9993	0,080	0,024	0,65
Endosulfán II	3,4	4,8	6,0	0,9993	0,042	0,013	0,34
4,4'-DDD	13	11	11	0,9995	0,051	0,015	0,42
Sulfato de endosulfán	5,0	6,1	7,4	0,9996	0,050	0,015	0,41
4,4'-DDT	15	13	6,1	0,9966	0,52	0,16	4,2
Cetona de endrina	2,0	5,7	4,3	0,9993	0,020	0,006	0,16
Tetrametrina	2,2	6,0	6,9	0,9984	0,091	0,027	0,74
Metoxicloro	5,8	11	21	0,9999	0,12	0,036	0,98
λ-Cihalotrina	17	9,5	9,2	0,9994	0,74	0,22	6,1
Cifenotrina	9,2	11	12	0,9921	1,0	0,31	8,4
Permetrina	14	17	8,4	0,9941	0,98	0,29	8,0
Ciflutrina	8,6	8,9	12	0,9949	1,1	0,33	9,0
Cipermetrina	13	13	12	0,9993	0,93	0,28	7,6
Flucitrinato	12	12	8,3	0,9992	0,65	0,20	5,3
Fenvalerato	17	15	14	0,9990	1,0	0,30	8,2
Deltametrina	18	11	7,7	0,9984	1,9	0,56	15

3.2.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE CON DIFERENTE CONTENIDO GRASO

El método desarrollado en este estudio se aplicó a la extracción de los pesticidas investigados de **diferentes muestras de leche**. En primer lugar se estudiaron cuatro marcas diferentes de **leche entera comercial** (tres líquidas y una en polvo) con un contenido en grasa comprendido entre el 3,5 y el 3,6%, y una muestra de **leche en crudo** con un contenido graso similar (3,7%). Estas muestras, en las que inicialmente no se encontraron concentraciones detectables de los analitos, se fortificaron con los pesticidas estudiados a un nivel de 10 ng mL^{-1} y se analizaron siguiendo la metodología DSPME-GC- μ ECD propuesta. Tal y como se muestra en la Figura IV.3.11, en la que se representan los resultados obtenidos para algunos de los compuestos investigados, no se observaron diferencias significativas entre las muestras analizadas. De hecho, la variabilidad observada entre muestras se puede atribuir al error experimental.

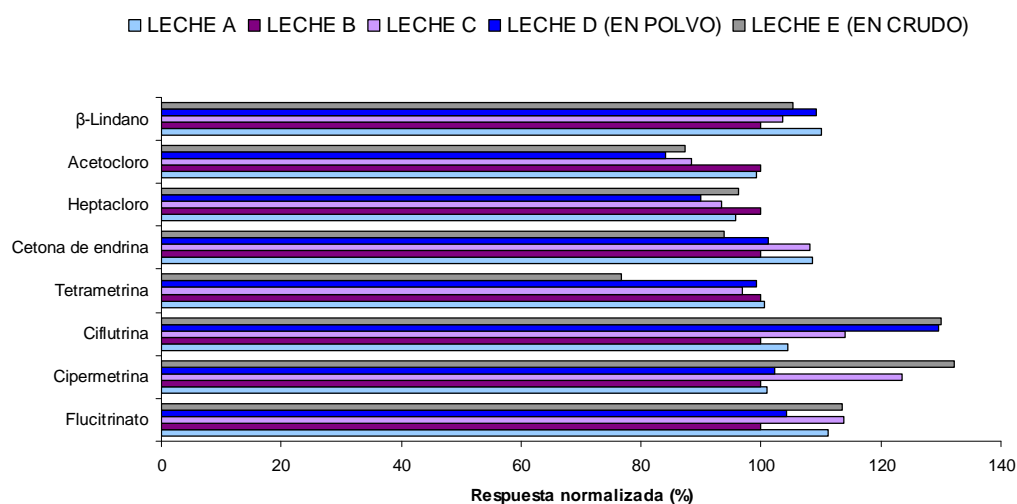


Figura IV.3.11 Influencia de la marca comercial en la extracción de algunos de los pesticidas investigados de muestras de leche entera comercial y comparación con leche en crudo. Las respuestas están normalizadas a las obtenidas para la leche B.

Se deduce por tanto que las **recuperaciones de la leche en crudo** son equivalentes a las de la leche comercial con un porcentaje de grasa similar. Estos resultados demuestran que es posible utilizar la **calibración externa** para cuantificar los pesticidas objetivo en muestras de leche (tratada o en crudo) empleando estándares

preparados en leche de las mismas características en cuanto al contenido graso (estándares *milk-matched*).

Utilizando el mismo procedimiento de SPME, se analizaron también muestras de leche **desnatada y semidesnatada** fortificadas. En la Figura IV.3.12 se comparan las respuestas obtenidas en estas pruebas para algunos de los analitos investigados.

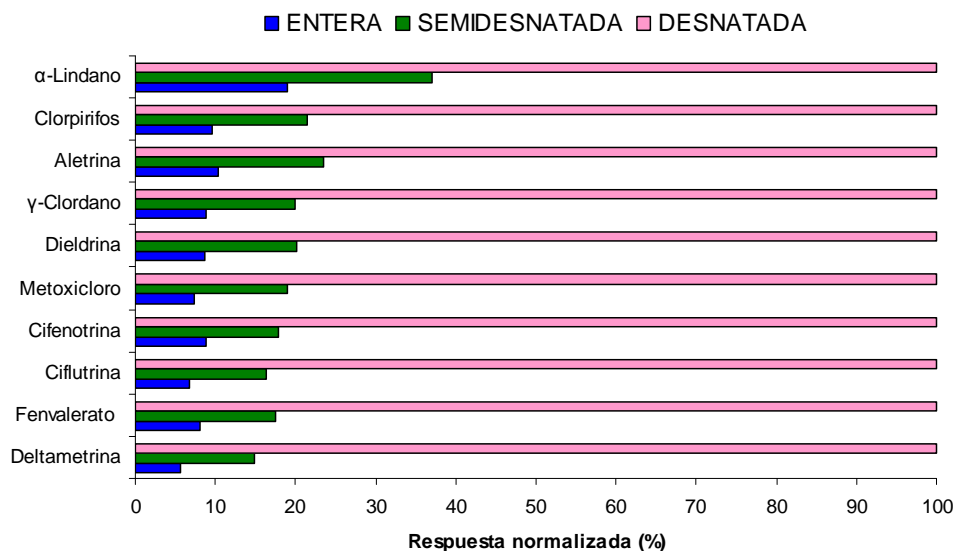


Figura IV.3.12 Influencia del contenido graso en la extracción de algunos pesticidas de la leche. Las respuestas se han normalizado a las obtenidas para leche desnatada.

De los resultados representados en la Figura IV.3.12 se deduce que la eficacia de la extracción está inversamente relacionada con el **contenido graso** de la leche. En el caso de la leche desnatada (0,3% grasa), las respuestas obtenidas fueron hasta 17 veces mayores (deltametrina) que las obtenidas para la leche entera (3,6%); mientras que las diferencias entre la leche entera y la semidesnatada (1,55% grasa) no fueron tan grandes (alrededor de 2 veces mayores para la mayoría de los compuestos).

3.2.5 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD

Las **recuperaciones del método** se estudiaron analizando varias muestras de leche entera, tres líquidas (A-C) y una en polvo (D), fortificadas a diferentes niveles de concentración (10, 15 o 60 ng mL⁻¹) y cuantificadas mediante calibración externa

3. PESTICIDAS EN LECHE

utilizando estándares *milk-matched*. En análisis previos de estas muestras no se detectaron ninguno de los analitos. Los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla IV.3.6, permiten concluir que en todas las muestras analizadas se obtuvieron recuperaciones por encima del 80% para la mayoría de los pesticidas.

Tabla IV.3.6 Recuperaciones de los pesticidas investigados en diferentes muestras de leche entera fortificadas a distintos niveles de concentración.

	Recuperación (%)			
	LECHE A (10 ng mL ⁻¹)	LECHE B (60 ng mL ⁻¹)	LECHE C (15 ng mL ⁻¹)	LECHE D (10 ng mL ⁻¹)
α-Lindano	99	88	108	100
β-Lindano	107	94	109	101
γ-Lindano	104	92	109	100
Teflutrina	85	81	113	116
δ-Lindano	92	94	114	96
Acetocloro	115	98	112	81
Transflutrina	103	78	96	98
Alacloro	96	94	109	119
Heptacloro	101	85	108	101
Fenitrotion	106	94	112	96
Aldrina	99	77	97	101
Clorpirifos	102	92	88	99
Epóxido de heptacloro	104	82	94	92
Aletrina	97	84	96	91
γ-Clordano	104	82	118	97
Endosulfán I	104	84	96	94
α-Clordano	139	77	102	113
4,4'-DDE	97	94	97	95
Dieldrina	98	83	93	91
Endrina	93	84	93	91
Endosulfán II	97	87	96	94
4,4'-DDD	95	81	91	85
Sulfato de endosulfán	93	92	98	95
4,4'-DDT	80	76	119	87
Cetona de endrina	93	91	96	93
Tetrametrina	124	83	102	102
Metoxicloro	94	93	97	82
λ-Cihalotrina	111	81	96	97
Cifenotrina	118	69	118	117
Permetrina	122	81	118	112
Ciflutrina	120	72	100	120
Cipermetrina	105	78	93	103
Flucitrinato	104	77	94	98
Fenvalerato	114	80	112	113
Deltametrina	80	95	100	101

El método también se validó mediante el análisis de un **material de referencia** (leche entera en polvo, BCR-188) cuyo contenido **certificado** en pesticidas organoclorados se ha incluido en la Tabla IV.3.7. La cuantificación de estos compuestos se llevó a cabo tanto por calibrado externo como por el método de las adiciones estándar. Los resultados obtenidos siguiendo ambos procedimientos se muestran en la Tabla IV.3.7. Las concentraciones se expresaron en ng g^{-1} , considerando que cada mL de leche analizado correspondía a la disolución de 0,13 g de material de referencia en 0,9 mL de agua. Además, los resultados se corrigieron teniendo en cuenta el porcentaje de humedad del material de referencia (2,5%), determinado en el laboratorio por el método de la pérdida de peso en un horno a 102 °C.

Las concentraciones estimadas concuerdan con los valores certificados, obteniéndose recuperaciones por encima del 75% en todos los casos, excepto para la endrina (67% de recuperación por el calibrado externo) y para el 4,4'-DDT (71% de recuperación por el método de las adiciones estándar).

Tabla IV.3.7 Validación del método: análisis de un material de referencia certificado (BCR-188).

Pesticida	valor certificado (ng g^{-1})	calibración externa		adición estándar	
		valor estimado (ng g^{-1})	recuperación (%)	valor estimado (ng g^{-1})	recuperación (%)
β -Lindano	$12,0 \pm 1,2$	$12,6 \pm 0,8$	105	$13,1 \pm 0,7$	109
γ -Lindano	$45,4 \pm 2,9$	$44,4 \pm 1,3$	98	$39,9 \pm 1,5$	88
Epóxido de heptacloro	$32,0 \pm 1,8$	$27,6 \pm 1,5$	86	$31,7 \pm 2,0$	99
4,4'-DDE	$51,3 \pm 3,5$	$59,7 \pm 5,0$	116	$44,2 \pm 5,9$	86
Dieldrina	$36,1 \pm 2,4$	$32,5 \pm 0,1$	90	$31,8 \pm 0,1$	88
Endrina	$6,2 \pm 0,9$	$4,1 \pm 0,5$	67	$4,9 \pm 0,5$	79
4,4'-DDT	$69,0 \pm 4,6$	$70,9 \pm 7,2$	103	$49,3 \pm 7,4$	71

3.2.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE REALES

Finalmente, la metodología propuesta se aplicó al análisis de **muestras de leche comercial**, así como de **muestras de leche cruda** (sin tratar) obtenidas de explotaciones ganaderas de vacuno lechero de Galicia. No se encontraron residuos de pesticidas en ninguna de las 35 muestras analizadas, salvo en una, en la que se

detectó γ -clordano a una concentración de 1 ng mL^{-1} ($8,2 \text{ ng g}^{-1}$) y, por lo tanto, por encima del MRL correspondiente (2 ng g^{-1}) establecido por la legislación europea.

En este trabajo se ha desarrollado un procedimiento simple, rápido y efectivo para la cuantificación de 35 pesticidas en leche, basado en la combinación de la **microextracción en fase sólida con GC- μ ECD**. Con el método propuesto se manejan volúmenes de muestra muy pequeños (1 mL); además, las muestras de leche analizadas no requieren un pretratamiento e, independientemente de su contenido graso, se pueden cuantificar mediante calibración externa siempre y cuando se utilicen estándares *milk-matched* preparados en leches con contenidos grasos equivalentes.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Heck, M.-C.; Sifuentes dos Santos, J.; Bogusz, J. S.; Costabeber, I.; Emanuelli, T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Chem.* **2007**, 102, 288-294.
- [2] Losada, A.; Fernández, N.; Diez, M.J.; Terán, M.T.; García, J.J.; Sierra, M. Organochlorine pesticide residues in bovine milk from León (Spain). *Sci. Total Environ.* **1996**, 181, 133-135.
- [3] Cardeal, Z.L.; Dias-Paes, C.M. Analysis of organophosphorus pesticides in whole milk by solid phase microextraction gas chromatography method. *J. Environ. Sci. Health., Part B* **2004**, 41, 369-375.
- [4] Salas, J.H.; González, M.M.; Noa, M.; Pérez, N.A.; Díaz, G.; Gutiérrez, R.; Zazueta, H.; Osuna, I. J. Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk. *Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4468-4471.
- [5] Kituyi, E.N.; Wandiga, S.O.; Jumba, I.O. Occurrence of chlorfenvinphos residues in cow's milk sampled at a range of sites in Western Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, 58, 969-975.
- [6] Mueller, J.F.; Harden, F.; Toms, L.-M.; Symons, R.; Fürst, P. Persistent organochlorine pesticides in human milk samples from Australia. *Chemosphere* **2008**, 70, 712-720.

- [7] Ennaceur, S.; Gandoura, N.; Driss, M.R. Organochlorine pesticide residues in human milk of mothers living in Northern Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2007**, 78, 325-329.
- [8] Khay, S.; Abd El-Aty, A.M.; Choi, J.-H.; Shin, E.-H.; Shin, H.-C.; Kim, J.-S.; Chang, B.-J.; Lee, C.-H.; Shin, S.-C.; Jeong, J.Y.; Shim, J.-H. Simultaneous determination of pyrethroids from pesticide residues in porcine muscle and pasteurized milk using GC. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 244-251.
- [9] Bouwman, H.; Sereda, B.; Meinhardt, H.M. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environ. Poll.* **2006**, 144, 902-917.
- [10] Malarvannan, G.; Kunisue, T.; Isobe, T.; Sudaryanto, A.; Takahashi, S.; Prudente, M.; Subramanian, A.; Tanabe, S. Organohalogen compounds in human breast milk from mothers living in Payatas and Malate, the Philippines: levels, accumulation kinetics and infant health risk. *Environ. Poll.* **2009**, 157, 1924-1932.
- [11] Schenck, F.J.; Wagner, R. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Addit. Contam.* **1995**, 12, 535-541.
- [12] Tsoutsis, C.S.; Albanis, T.A. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, 84, 3-13.
- [13] Deger, A.B.; Gremm, T.J.; Frimmel, F.H.; Mendez, L. Optimization and application of SPME for the gas chromatographic determination of endosulfan and its major metabolites in the ng L⁻¹ range in aqueous solutions. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 376, 61-68.
- [14] Polo, M.; Gómez-Noya, G.; Quintana, J.B.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry method for polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in water samples. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1054-1062.
- [15] Polo, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Multivariate optimization of a solid-phase microextraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1072, 63-72.

- [16] García-Jares, C.; Llompart, M.; Polo, M.; Salgado, C.; Macías, S.; Cela, R. Optimisation of a solid-phase microextraction method for synthetic musk compounds in water. *J. Chromatogr. A* **2002**, 963, 277-285.
- [17] Llompart, M.; Lourido, M.; Landin, P.; García-Jares, C.; Cela, R. Optimization of a derivatization–solid-phase microextraction method for the analysis of thirty phenolic pollutants in water samples. *J. Chromatogr. A* **2002**, 963, 137-148.

CAPÍTULO IV.4. ESTUDIO DE LA FOTODEGRADACIÓN DE INSECTICIDAS PIRETROIDES

La sensibilidad de los pesticidas a la **luz** es uno de los principales factores que determinan la **duración residual** de estos compuestos, por lo que la **velocidad de las transformaciones fotoquímicas** de los mismos así como el impacto biológico y toxicológico de los **fotoproductos** generados son aspectos importantes a tener en cuenta en el diseño y aplicación de pesticidas utilizados para el control de plagas en el **ámbito agrícola**. Por otro lado, el **uso doméstico** de insecticidas y la actividad industrial asociada, que afecta particularmente a los países desarrollados, generan grandes cantidades de **aguas residuales**. De manera que los **procesos de fotodegradación de pesticidas** también son importantes desde el punto de vista del **tratamiento fotoquímico** (con **radiación UV**) al que habitualmente se recurre para la purificación de aguas contaminadas con compuestos orgánicos.

El objetivo de este estudio es utilizar la **foto-SPME** acoplada a **GC-MS** para investigar la fotodegradación de **doce piretroides** y de un **sinergista** (butóxido de piperonilo, PBO). En primer lugar, se investigaron las **cinéticas de fotodegradación** de estos compuestos y se estimaron los correspondientes **parámetros cinéticos** (constantes de velocidad aparentes y tiempos de vida media). Además, basándose en los espectros de masas y en la bibliografía disponible, se identificaron tentativamente un elevado número de **fotoproductos** de los cuales se registraron las correspondientes **cinéticas de fotoformación-fotodegradación**. Finalmente, se propusieron **rutas de fotodegradación** para cada uno de los compuestos estudiados.

Los **analitos investigados** en este trabajo se han dividido en tres grupos:

- **piretroides dihalogenovinílicos de uso agrícola habitual** (λ -cihalotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina).
- **piretroides** (empentrina, transflutrina, aletrina, fenotrina, cifenotrina) y **sinergista** (PBO) **de uso doméstico habitual**.
- **piretroides carentes de anillo ciclopropano** (flucitrinato, fenvalerato).

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 MUESTRAS ANALIZADAS

Para los experimentos de **foto-SPME** se prepararon muestras de agua ultrapura conteniendo uno o varios de los analitos ($1\text{-}100\text{ ng mL}^{-1}$) por adición de los volúmenes correspondientes de las disoluciones apropiadas en acetona. Una vez preparadas, las muestras se dividieron en alícuotas de 6 u 8 mL (en función de los piretroides estudiados), las cuales se mantuvieron en el congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se descongelaron 20 min antes de la extracción. Operando de esta manera se consigue mejorar la precisión de los análisis de piretroides en agua mediante SPME [1].

Para las mediciones espectrales, se prepararon disoluciones acuosas individuales ($2\text{-}10\text{ ng mL}^{-1}$) de cada uno de los compuestos investigados en agua ultrapura.

4.1.2 SPME Y PROCEDIMIENTOS DE FOTODEGRADACIÓN

El proceso de **fotodegradación en fibra** (foto-SPME) consta de **dos etapas**. En primer lugar, se lleva a cabo la **extracción mediante SPME** de los analitos. Una vez finalizado el tiempo de extracción correspondiente, los compuestos investigados se encuentran absorbidos en el recubrimiento polimérico de la fibra de SPME. En la Figura IV.4.1 se muestra un esquema del **procedimiento** empleado para la extracción de los piretroides y del PBO mediante SPME (a), a excepción del flucitrinato y del fenvalerato para los que se empleó el procedimiento (b).

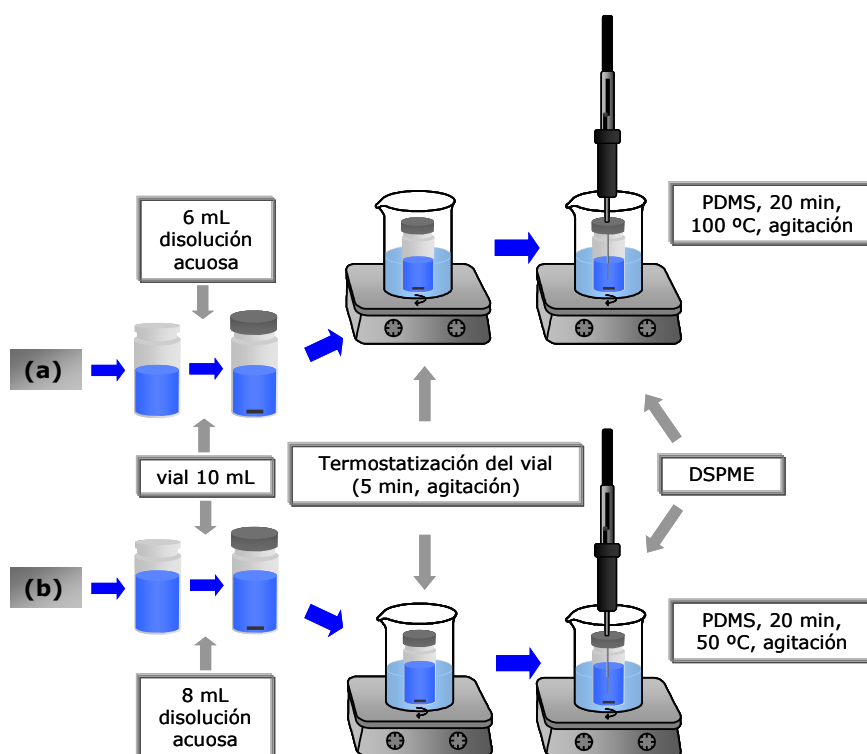


Figura IV.4.1 Esquema de extracción de los piretroides y del PBO en agua por SPME.

Después de esta primera etapa (SPME), el paso siguiente es la **exposición de la fibra a la radiación** durante el tiempo correspondiente.

En este trabajo se han empleado distintos tipos de radiación:

- **Radiación UV** procedente de un fotorreactor diseñado en nuestro laboratorio, equipado con dos lámparas de mercurio de baja presión de **8 y 10 W** de potencia, que emiten a una longitud de onda de **254 nm** (Figura IV.4.2). También se han realizado algunas pruebas utilizando una lámpara de fluorescencia negra (8 W, 366 nm).

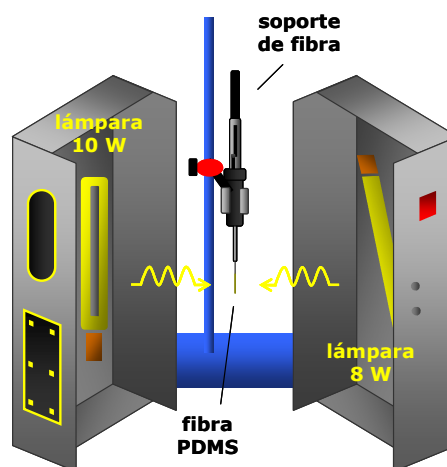


Figura IV.4.2 Disposición de la fibra de SPME en el fotorreactor diseñado en nuestro laboratorio.

- **Luz solar natural.** La irradiación con luz solar natural se llevó a cabo en dos días durante la primavera de 2006 (8 y 9 de Junio) en los que la media de radiación solar estimada fue de **658 W/m²**. Las pruebas se realizaron en el jardín de nuestro Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios (I.I.A.A.) en la Universidad de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, 42° 52' N, 8° 33' W), entre las 11 a.m. y las 7 p.m, de manera que el tiempo total de exposición fue de 16 h. En estos experimentos de fotodegradación (realizados para λ -cihalotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina y deltametrina) la fibra se colocó en posición horizontal con el objetivo de que la incidencia de los rayos de sol fuera la mayor posible (Figura IV.4.3).

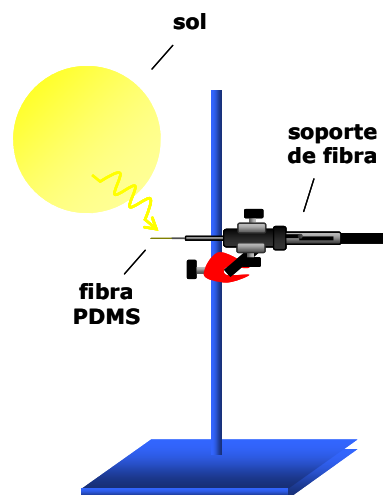


Figura IV.4.3 Disposición de la fibra en las pruebas con luz solar natural.

Una vez transcurrido el tiempo de irradiación correspondiente, la fibra se inserta directamente en el inyector del cromatógrafo de gases (desorción durante 5 min a 280 °C) y se procede al **análisis mediante GC-MS**.

En los **experimentos control** (0 min de irradiación) la fibra no se expone a la radiación tras la etapa de extracción, si no que se inserta directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.

4.1.2 TEST DE OSCURIDAD

En el **test de oscuridad**, la fibra con los analitos absorbidos se introduce en el fotorreactor durante 40-60 min, protegiendo la fibra de la radiación mediante su retracción en el interior del soporte de SPME. A continuación se procede a la desorción de la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases.

4.1.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y DETECCIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES

Para los estudios de fotodegradación de los piretroides (a excepción del flucitrinato y del fenvalerato) y del PBO se utilizó un **cromatógrafo de gases Varian 3800**, equipado con un inyector 1079 split/splitless, y acoplado a un **espectrómetro de masas con trampa de iones Varian Saturn 2000**. Para el control del equipo y la adquisición y tratamiento de los datos se utilizó el programa informático Saturn GC-MS Workstation v5.4. Las **condiciones instrumentales** utilizadas en este estudio se resumen en la Tabla IV.4.1.

Tabla IV.4.1 Condiciones instrumentales empleadas en el GC-MS para el estudio de la fotodegradación de la mayoría de los piretroides y del PBO.

GC VARIAN 3800	
Inyector	Split/splitless
Temperatura	280 °C
Modo de inyección	splitless
Tiempo de purga	2 min
Columna	HP-5MS
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	60 °C (2 min)
Rampa de temperatura 1	20 °C min ⁻¹ hasta 230 °C
Rampa de temperatura 2	5 °C min ⁻¹ hasta 270 °C (6 min)
Tiempo total de análisis	24,5 min
Gas portador	He
Flujo en columna	1,2 mL min ⁻¹ (constante)
MS VARIAN SATURN 2000	
Ionización MS	
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI, 70 eV)
Modo de adquisición	Full scan
Intervalo de masas	40-450 m/z
Velocidad de barrido	0,6 s scan ⁻¹
Temperatura interfase	300 °C
Temperatura trampa de iones	250 °C
Temperatura manifold	120 °C
Voltaje del multiplicador	2150 V

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

Los estudios de fotodegradación del fenvalerato y del flucitrinato se realizaron en un **cromatógrafo de gases Varian 450**, equipado con un inyector 1079 split/splitless, y acoplado a un **espectrómetro de masas con trampa de iones Varian 240**. Para el control del equipo y la adquisición y tratamiento de los datos se utilizó el programa informático Saturn GC-MS Workstation v6.9. Las **condiciones instrumentales** empleadas en este estudio se muestran en la Tabla IV.4.2.

Tabla IV.4.2 Condiciones instrumentales empleadas en el GC-MS para el estudio de la fotodegradación del fenvalerato y del flucitrinato.

GC VARIAN 450	
Inyector	Split/splitless
Temperatura	280 °C
Modo de inyección	splitless
Tiempo de purga	2 min
Columna	HP-5MS
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	80 °C (2 min)
Rampa de temperatura 1	15 °C min ⁻¹ hasta 200 °C
Rampa de temperatura 2	3 °C min ⁻¹ hasta 235 °C (1 min)
Rampa de temperatura 3	20 °C min ⁻¹ hasta 300 °C (5 min)
Tiempo total de análisis	30,92 min
Gas portador	He
Flujo en columna	1 mL min ⁻¹ (constante)
MS VARIAN SATURN 240	
Ionización MS	
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI, 70 eV)
Modo de adquisición	Full scan
Intervalo de masas	40-450 m/z
Damping gas	He
Flujo	2,5 mL min ⁻¹
Velocidad de barrido	0,7 s scan ⁻¹
Temperatura interfase	300 °C
Temperatura trampa de iones	150 °C
Temperatura manifold	40 °C
Voltaje del multiplicador	1750 V

Para el fenvalerato y el flucitrinato también se llevaron a cabo algunos experimentos preliminares en un **cromatógrafo de gases** Hewlett-Packard modelo 6890, equipado con un detector **^{63}Ni de microcaptura electrónica** (μECD) y provisto de un inyector split/splitless. La temperatura del detector se estableció en 300 °C y se utilizó nitrógeno como gas auxiliar con un flujo de 30 mL min⁻¹.

4.1.4 MEDIDA DE ESPECTROS UV-VIS

Los espectros de absorción de los compuestos investigados se adquirieron en un **espectrómetro de doble haz** Jasco modelo V-530, equipado con un **monocromador** y con dos **detectores de fotodiodos** de silicio (S1337) con un ancho de banda espectral de 2 nm. Se trabajó a temperatura ambiente y, para hacer las medidas, se utilizaron dos **celdas de precisión de cuarzo** de 1 cm de diámetro: una de ellas conteniendo la disolución acuosa de cada analito en particular y la otra conteniendo agua ultrapura como referencia.

4.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PIRETROIDES DIHALOGENOVINÍLICOS

En los Capítulos anteriores ya se ha comentado que algunos de los productos comerciales a partir de los cuales se prepararon las disoluciones de trabajo de los piretroides contienen **mezclas de isómeros**, pudiendo dar lugar a **clusters de picos cromatográficos**. Con el programa de temperaturas especificado en la Tabla IV.4.1, λ -cihalotrina, permetrina y deltametrina mostraron dos picos perfectamente resueltos y, por lo tanto, se cuantificaron por separado; mientras que para la ciflutrina y la cipermetrina se obtuvieron en cada caso cuatro picos que no están completamente resueltos, por lo que se cuantificaron conjuntamente. En la Tabla IV.4.3 se incluyen los **tiempos de retención e iones de cuantificación** de los piretroides dihalogenovinílicos investigados en este estudio.

Tabla IV.4.3 Tiempos de retención e iones de cuantificación de los piretroides estudiados.

Compuesto	t _r (min)	Iones de cuantificación
λ-Cihalotrina (1)	14,97	181+197
λ-Cihalotrina (2)	15,22	181+197
cis-Permetrina	16,15	183
trans-Permetrina	16,34	183
Ciflutrina	17,02-17,34	163
Cipermetrina	17,48-17,80	163
Deltametrina (1)	19,84	253+181
Deltametrina (2)	20,26	253+181

Los **espectros de masas teóricos y experimentales** de estos pesticidas se muestran en la Figura IV.4.4.

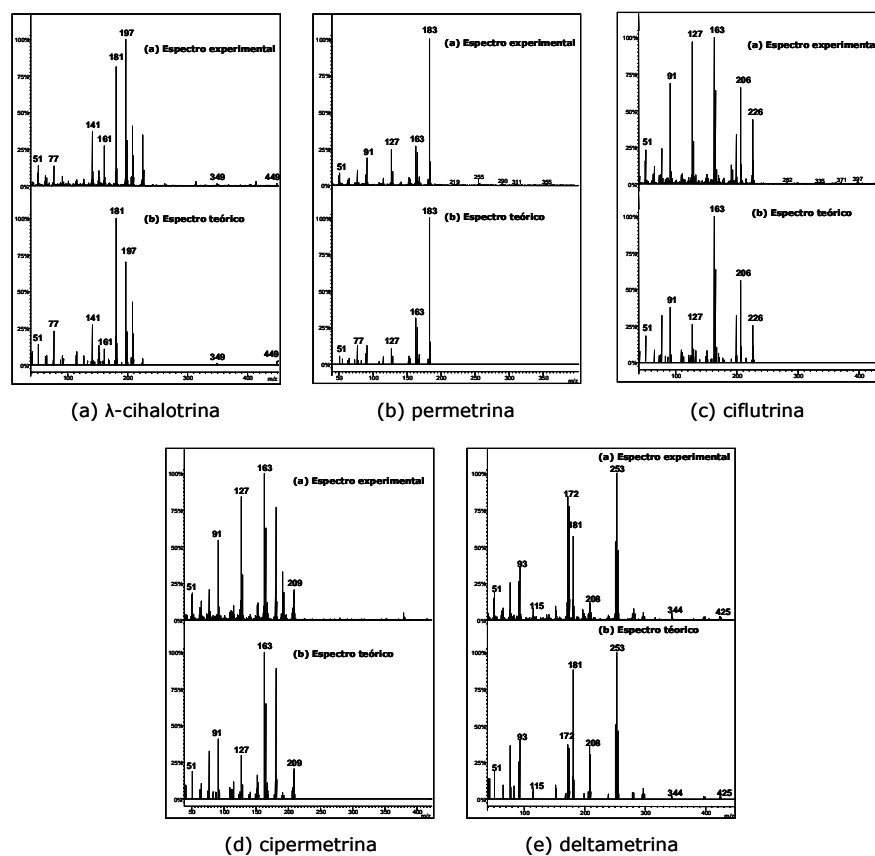


Figura IV.4.4 Espectros de masas teóricos y experimentales de los piretroides estudiados: (a) λ-cihalotrina; (b) permetrina; (c) ciflutrina; (d) cipermetrina; (e) deltametrina.

4.2.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

4.2.1.1 Espectros UV

Se midieron los **espectros UV** de los piretroides investigados utilizando disoluciones acuosas de dichos compuestos a niveles de concentración comprendidos entre 2 y 6 ng mL⁻¹. Se observó que todos los analitos absorben en la misma región espectral con un máximo de absorción situado alrededor de **264 nm**, es decir, muy cerca de la longitud de onda (254 nm) de las lámparas de mercurio de baja presión usadas en este estudio.

En la Tabla IV.4.4 se incluyen los **coeficientes de absorción molar** calculados a **254 nm** (ϵ_{254}) a partir de los datos espectrales obtenidos. A la vista de estos resultados se deduce que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, la deltametrina absorbe más fotones que los otros piretroides investigados. En cuanto a la ciflutrina, cipermetrina y λ -cihalotrina, éstos presentan valores intermedios de absorción; siendo la permetrina el que posee un coeficiente de absorción más bajo. De ser el número de fotones absorbidos el único factor determinante de la velocidad de degradación fotoquímica de estos compuestos, se podría esperar una fotodegradación más rápida para la deltametrina, seguida de la ciflutrina, cipermetrina y λ -cihalotrina, mientras que para la permetrina se podría predecir una transformación fotolítica más lenta.

Tabla IV.4.4 Coeficientes de absorción molar a 254 nm de los piretroides estudiados.

Compuesto	ϵ_{254} (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
Deltametrina	4,15·10 ⁷
Ciflutrina	3,09·10 ⁷
Cipermetrina	1,97·10 ⁷
λ -Cihalotrina	1,36·10 ⁷
Permetrina	9,86·10 ⁶

4.2.1.2 Test de oscuridad

Antes de aplicar la foto-SPME al estudio de la fotodegradación de los piretroides se realizó un **test de oscuridad**, con el objetivo de demostrar que la disminución de la

respuesta analítica de los pesticidas en las pruebas en las que la fibra de SPME es irradiada se debe únicamente a **procesos de degradación fotoquímica**. Para ello, se realizaron los siguientes experimentos:

1. **Control:** Se tomó una alícuota de 6 mL de la disolución de 20 ng/mL de los compuestos estudiados en agua Milli-Q. Tras la extracción mediante SPME, la fibra se introdujo en el inyector del cromatógrafo de gases para su posterior análisis mediante GC-MS. Esta extracción se utilizó como referencia.
2. **Foto-SPME:** Se tomó otra alícuota de 6 mL de la misma disolución de 20 ng/mL. Tras la etapa de extracción, la fibra se expuso a la luz UV ($\lambda = 254$ nm, 18 W) durante 40 min. A continuación la fibra se introdujo en el inyector del cromatógrafo de gases para su posterior análisis mediante GC-MS.
3. **Test de oscuridad:** Se repitió el experimento anterior con la diferencia de que, en la etapa de irradiación, la fibra se retrajo evitando de esta manera que la luz UV llegara a los compuestos retenidos en la fibra.

En la Figura IV.4.5 se han representado los resultados obtenidos en estas pruebas.

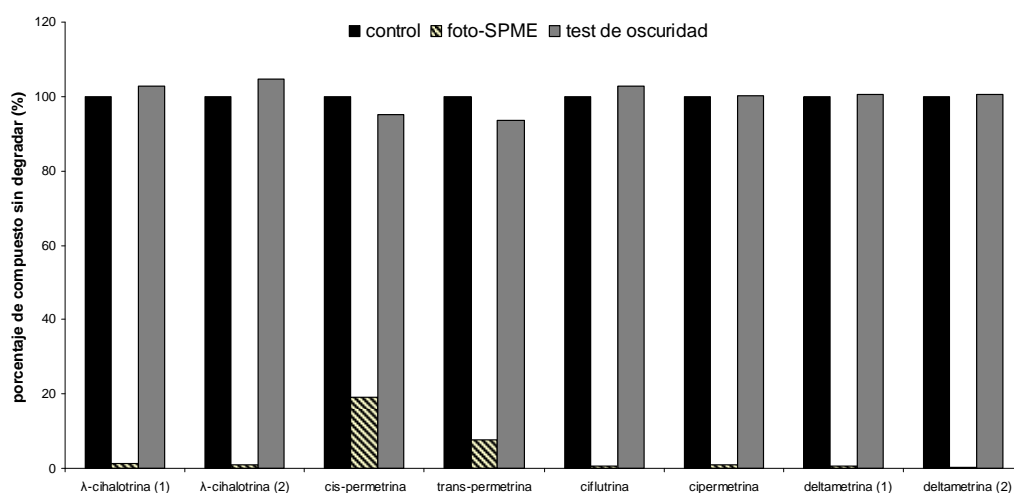


Figura IV.4.5 Resultados del test de oscuridad y de la foto-SPME (40 min) para los piretroides estudiados comparados con los obtenidos en el experimento control.

La disminución drástica del área de pico en las pruebas en las que la fibra se expuso a la luz UV en relación a la extracción utilizada como control confirma la **fotodegradación** de los analitos en el soporte polimérico de la fibra de SPME.

Además, el hecho de que los resultados obtenidos en las extracciones de referencia y en las pruebas en las que la fibra se mantuvo retraída durante la irradiación con luz UV sean del mismo orden confirma que no existen pérdidas de analito por otras vías distintas de la fotolítica.

4.2.2 FOTO-SPME

4.2.2.1 Influencia del tiempo de irradiación

Se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de evaluar la influencia del tiempo de exposición de la fibra a la luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 18 W). Para ello se tomaron alícuotas de 6 mL de la disolución de 20 ng/mL de los piretroides estudiados en agua

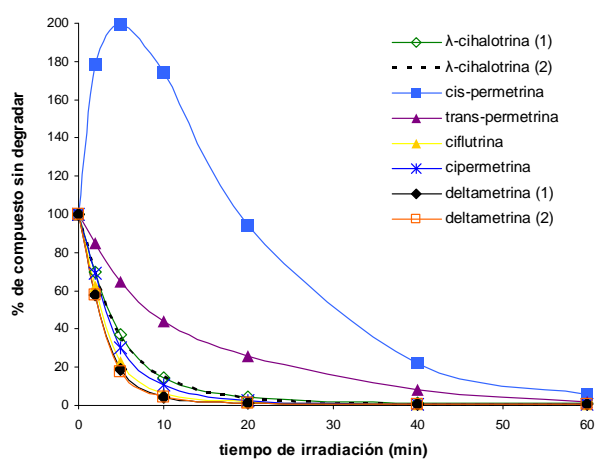


Figura IV.4.6 Cinéticas de la fotodegradación en fibra de los piretroides estudiados.

Milli-Q. Tras la etapa de extracción, la fibra se expuso a la luz UV durante diferentes períodos de tiempo (**2-60 min**), para su posterior análisis mediante GC-MS. Se realizó también una extracción previa, sin exposición a la luz UV, que sirvió como referencia. En la Figura IV.4.6 se han representado los valores medios de los duplicados realizados.

De la Figura IV.4.6 se deduce que, tras 20 min de exposición a la luz UV, λ -cihalotrina, ciflutrina, cipermetrina y deltametrina se han degradado casi por completo (pérdidas de más del 95%). Sin embargo, la fotodegradación de la *trans*-permetrina es más lenta y, tras ese tiempo de irradiación, aún queda alrededor de un 25% sin degradar. Por otra parte, se aprecia un incremento en el área de pico para la *cis*-permetrina durante los primeros minutos de exposición, hecho que se ha atribuido a la fotoisomerización del isómero *trans*. Estos resultados coinciden con los publicados por

Holmstead y col. [2] que también propusieron la isomerización como una de las rutas de fotodegradación de la permetrina.

En la Figura IV.4.7, en la que se han superpuesto los cromatogramas obtenidos en los experimentos de foto-SPME correspondientes a 0, 5, 20 y 60 min de irradiación UV, se puede observar claramente el descenso (e incremento inicial, en el caso de la *cis*-permetrina) en la respuesta analítica de los piretroides estudiados a medida que aumenta el tiempo de exposición UV.

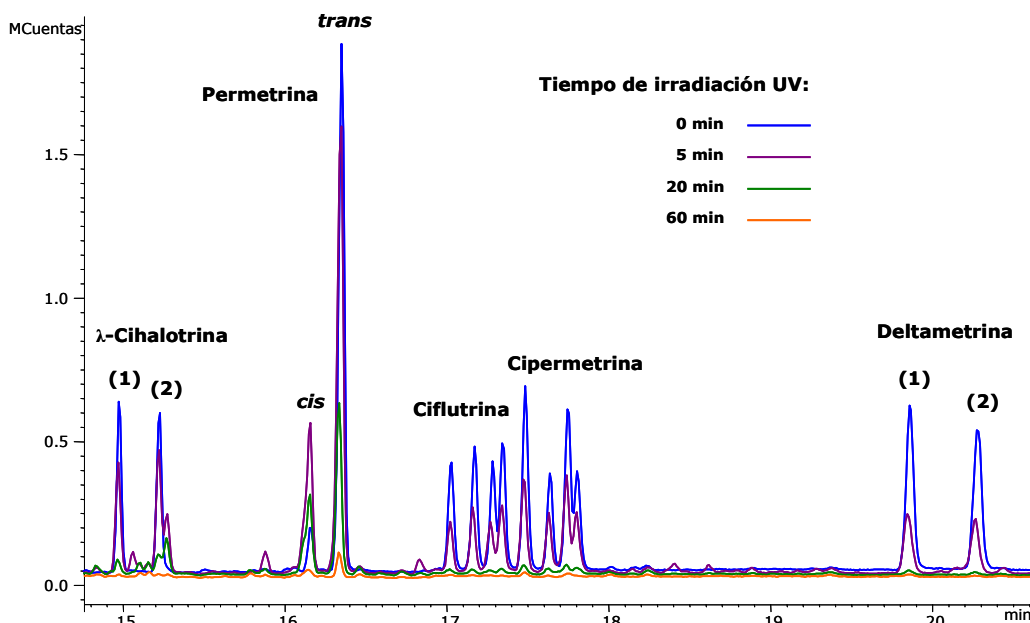


Figura IV.4.7 Superposición de los cromatogramas obtenidos para los piretroides estudiados en los experimentos de foto-SPME correspondientes a 0, 5, 20 y 60 min de irradiación UV (18 W).

4.2.2.2 Comportamiento cinético de primer orden

Tal y como se esperaba de la forma exponencial de las cinéticas de degradación obtenidas (Figura IV.4.6), se demostró que la fotodegradación de los piretroides estudiados se ajusta a un modelo cinético de **primer orden**. Para ello se representó, para cada uno de los analitos, el logaritmo neperiano del porcentaje de compuesto sin degradar frente al tiempo de irradiación y se observó que, efectivamente, los datos obtenidos se ajustaban a una línea recta (Figura IV.4.8). De hecho, en todos los casos

se obtuvieron **coeficientes de regresión (R^2) mayores de 0,988** (Tabla IV.4.5). Otros autores observaron también este orden de reacción para la *cis*- y *trans*-permetrina, la cipermetrina y la deltametrina [3-5]. Los rangos de tiempo considerados en cada uno de los ajustes terminaron en el punto en el que las curvas cinéticas comenzaron a tender asintóticamente hacia cero. Además, en el caso de la *cis*-permetrina, se tuvo en cuenta que su fotodegradación sólo fue apreciable después de 10 min de irradiación UV (ver Tabla IV.4.5), debido a la prevalencia de la fotoconversión entre isómeros detectada con tiempos de irradiación inferiores.

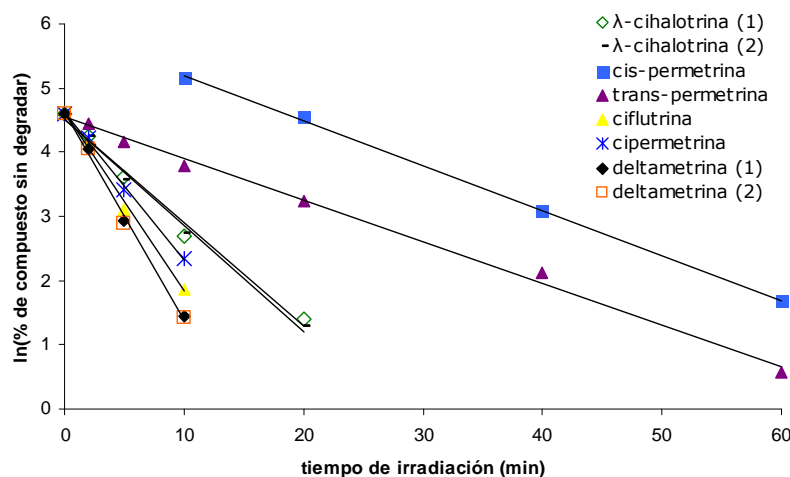


Figura IV.4.8 Demostración del comportamiento cinético de primer orden para la fotodegradación en fibra de los piretroides estudiados.

Teniendo en cuenta las ecuaciones del **Apartado 5.4** de la Introducción (**Capítulo I.5**), se pudieron estimar, a partir de las pendientes de las rectas de regresión obtenidas, tanto las constantes de velocidad de primer orden aparentes (k_{ap}) como los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) (Tabla IV.4.5).

Tabla IV.4.5 Parámetros cinéticos de los piretroides estudiados.

Compuesto	Rango evaluado (min)	R^2	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
Deltametrina (2)	0-10	0,9963	0,324	2,14
Deltametrina (1)	0-10	0,9973	0,320	2,17
Ciflutrina	0-10	0,9958	0,278	2,49
Cipermetrina	0-10	0,9966	0,230	3,01
λ -Cihalotrina (2)	0-20	0,9928	0,165	4,19
λ -Cihalotrina (1)	0-20	0,9882	0,160	4,32
<i>cis</i> -Permetrina	10-60	0,9994	0,0703	9,86
<i>trans</i> -Permetrina	0-60	0,9956	0,0648	10,7

De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla IV.4.5, el **orden de fotoestabilidad** de los analitos es: *trans*-permetrina > *cis*-permetrina > λ -cihalotrina (1) \sim λ -cihalotrina (2) > cipermetrina > ciflutrina > deltametrina (1) \sim deltametrina (2). Esta tendencia es consistente con los coeficientes de absorción molar mostrados en la Tabla IV.4.4. Así, la deltametrina parece ser el piretroide más fotorreactivo de los estudiados, lo cual se puede atribuir a su gran absorción a 254 nm. La mayor fotoestabilidad de la ciflutrina, cipermetrina y λ -cihalotrina se puede explicar en términos de su menor absorción UV, mientras que la degradación fotolítica más lenta de la permetrina es consistente con su menor absorbancia a 254 nm.

La mayor fotoestabilidad de los **piretroides cloro-sustituídos** comparada con la de la deltametrina (**bromo-sustituído**) ya había sido observada con anterioridad por Ruza y Casida [6, 7] en estudios en los que utilizaron luz solar y UV ($\lambda = 300$ nm). Por otro lado, Holmstead y col. [2] también apreciaron que la *cis*-permetrina se fotodegradaba más rápidamente que el isómero *trans* ($\lambda = 290$ nm y luz solar), aunque Rawn y col. [8] observaron lo contrario en experimentos de fotodegradación realizados con luz solar en agua de estanque. Finalmente, la mayor fotoestabilidad de la permetrina en relación con la de la cipermetrina (análogo α -ciano) también fue publicada por Ruza y col. [9], aunque, anteriormente, los mismos autores habían afirmado que el **grupo ciano** no afectaba significativamente a la velocidad de fotodegradación [6].

4.2.3 ESTUDIO CINÉTICO UTILIZANDO UNA MUESTRA DE AGUA REAL

La foto-SPME de estos piretroides también se estudió utilizando **muestras de agua residual** con adición de 20 ng mL⁻¹ de cada insecticida. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos en los experimentos realizados con agua ultrapura. De nuevo se demostró un comportamiento cinético de primer orden para la fotodegradación en fibra de los analitos y tan solo en el caso de los isómeros de la permetrina se observó un ligero descenso (no significativo) en las velocidades de fotodegradación. Por lo tanto se puede concluir que, en este caso particular, **no se apreció efecto matriz** asociado a la fotodegradación de los piretroides.

4.2.4 IDENTIFICACIÓN DE FOTOPRODUCTOS

Estudiando los cromatogramas obtenidos a cada tiempo de exposición de la fibra a la radiación UV se observó la aparición de picos cromatográficos y el aumento de su altura conforme aumentaba el tiempo de irradiación de la fibra con luz UV. Estos picos cromatográficos corresponden a la **formación de fotoproductos** de los piretroides estudiados aunque, posteriormente, para algunos de ellos también se observó una disminución de la altura como consecuencia de la fotodegradación de los propios fotoproductos.

En este estudio se detectó la generación de un elevado número de fotoproductos. Para **la identificación tentativa** de estos compuestos se compararon los **espectros de masas experimentales** y los encontrados en la **librería de espectros** (*NIST Spectral Database*). Sin embargo, puesto que los espectros de masas de un gran número de los fotoproductos de los compuestos estudiados no aparecen en la librería, en estos casos se recurrió al **análisis de los espectros de masas experimentales** (*clusters* de Br y Cl, pérdidas de fragmentos característicos, iones moleculares) y a la consulta de la **bibliografía disponible** acerca de la fotoquímica de los piretroides para así tratar de esclarecer la identidad de los productos de su fotodegradación.

Por otra parte, la **similitud estructural** entre los piretroides estudiados dificultó todavía más la identificación de los fotoproductos; de manera que, para facilitar el trabajo, se realizaron una serie de experimentos en los que se estudió individualmente la fotodegradación en fibra de cada compuesto. De esta manera, con los resultados obtenidos en estas pruebas se pudo conocer el **origen de los distintos fotoproductos**.

Como consecuencia de la ya mencionada semejanza estructural, los insecticidas objeto de estudio presentan una serie de **fotoproductos y rutas de fotodegradación comunes**. En la Tabla IV.4.6 se han incluido las estructuras, los tiempos de retención y los iones de cuantificación de los fotoproductos identificados. Se han marcado en negro los fotoproductos comunes a varios piretroides, y en diferentes colores los productos de degradación específicos de cada uno de estos pesticidas (λ -cihalotrina en rosa, permetrina en azul, ciflutrina en verde, cipermetrina en violeta y deltametrina en

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

naranja). En algunos casos (P 8, P 12, P 13, P 14, P 19, P 21, P 22, P 23, P 24) se obtuvieron varios picos a los que les correspondía el mismo espectro de masas, por lo que se asumió que estos grupos de picos se correspondían con **mezclas isoméricas**.

El uso de la **foto-SPME** para el estudio fotoquímico de los piretroides considerados permitió la identificación de varios compuestos (P 2, P 9, P 16 y P 17) que no habían sido detectados anteriormente por otros autores como fotoproductos de piretroides. Además, P 12, P 13, P 18, P 19, P 20, P 21 y P 23 tampoco se encontraron en la bibliografía disponible; sin embargo, a diferencia de los fotoproductos antes mencionados, estos compuestos probablemente se generen a través de rutas de fotodegradación que sí fueron previamente comentadas en otras publicaciones, a pesar de que sus estructuras químicas no habían sido propuestas con anterioridad.

Tabla IV.4.6 Estructuras, tiempos de retención (t_r) e iones de cuantificación de los fotoproductos generados e identificados en la foto-SPME de los piretroides estudiados.

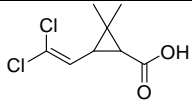
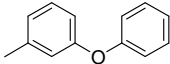
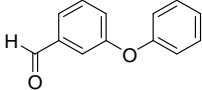
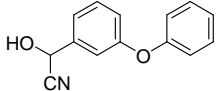
Código	Fotoproducto	Estructura	t_r (min)	Ion(es) de cuantificación
P 1	ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico		7,46	91, 127, 173
P 2	1-metil-3-fenoxibenceno		8,09	184
P 3	3-fenoxibenzaldehído		9,25	198
P 3*	hidroxi(3-fenoxifenil)acetonitrilo		9,25	198

Tabla IV.4.6 Estructuras, tiempos de retención (t_r) e iones de cuantificación de los fotoproductos generados e identificados en la foto-SPME de los piretroides estudiados, (continuación).

Código	Fotoproducto	Estructura	t_r (min)	Ion(es) de cuantificación
P 4	(3-fenoxifenil)metanol		9,75	200
P 5	(3-fenoxifenil)acetonitrilo		10,23	209
P 6	3-metilbut-2-enoato de ciano(3-fenoxifenil)metilo		13,39	83
P 7	ácido 3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-il)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico		6,42	141
P 8	[3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-il)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo		13,25- 14,70	141, 197
P 9	1-(clorometil)-3-fenoxibenceno		9,58	183, 218
P 10	ácido 3-fenoxibenzoico		10,27	214, 196
P 11	3-metilbut-2-enoato de 3-fenoxibencilo		12,18	83, 200
P 12	1-[3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropilmetil]-3-fenoxibenceno		12,87- 13,12	93, 129
P 13	1-[3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropilmetil]-3-fenoxibenceno		13,18- 14,15	91, 127, 163
P 14	3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 3-fenoxibencilo		15,24- 15,61	183

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

Tabla IV.4.6 Estructuras, tiempos de retención (t_r) e iones de cuantificación de los fotoproductos generados e identificados en la foto-SPME de los piretroides estudiados, (continuación).

Código	Fotoproducto	Estructura	t_r (min)	Ion(es) de cuantificación
P 15	cis-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 3-fenoxibencilo		16,52	183
P 16	dibenzo[b,d]furan-3-carbaldehído		10,15	139, 195
P 17	dibenzo[b,d]furan-3-il(oxo)acetonitrilo		10,82	195, 221
P 18	3-metilbut-2-enoato de ciano(4-fluoro-3-fenoxifenil)metilo		13,06	83
P 19	[3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](4-fluoro-3-fenoxifenil)acetonitrilo		15,39- 17,09	91, 127, 163
P 20	[3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](4-fluoro-3-fenoxifenil)acetonitrilo		15,88	93, 129
P 21	[3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo		14,58- 15,18	93, 129
P 22	[3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo		15,60- 16,65	91, 127, 163
P 23	[3-(2-bromovinil)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo		15,50- 16,34	94, 173
P 24	3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de α -ciano-3-fenoxibencilo		20,65- 20,98	253, 181

Sobre la base de los fotoproductos identificados (P 1-P 24) se concluyó que, en general, estos compuestos se generan a partir de procesos de **isomerización**, **ruptura del enlace éster y rutas relacionadas**, **formación de dimetilacrilatos**, **decarboxilación y dehalogenación reductiva**.

En las Figuras IV.4.9 y IV.4.10 se han incluido los **espectros de masas** de aquéllos fotoproductos que se han identificado sobre la base de los espectros teóricos de la librería de espectros de la NIST.

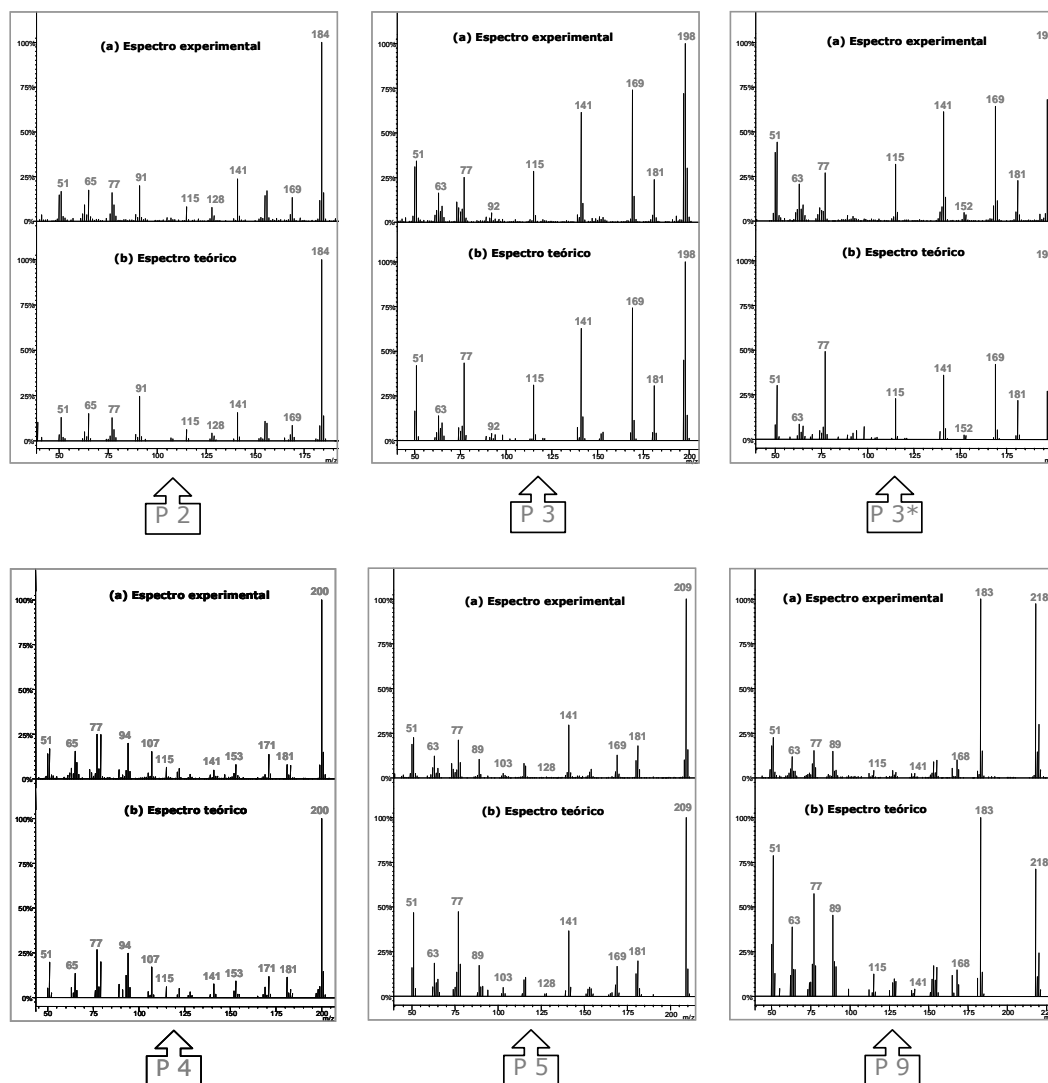


Figura IV.4.9 Espectros de masas teóricos y experimentales de P 2, P 3, P 3*, P 4, P 5 y P 9.

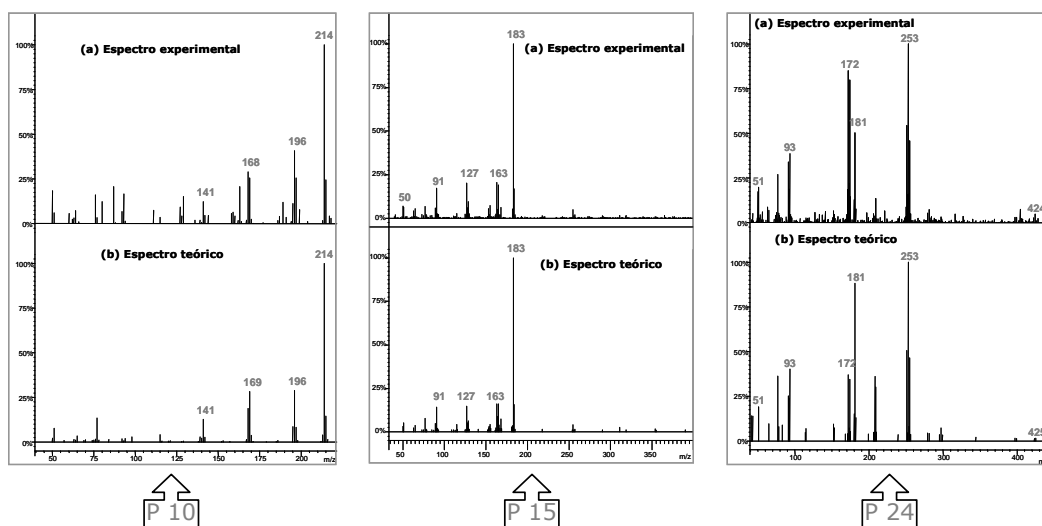


Figura IV.4.10 Espectros de masas teóricos y experimentales de P 10, P 15 y P 24.

Para elucidar la identidad de los restantes fotoproductos (P 1, P 6-P 8, P 11-P 14, P 16-P 23) se requirió la **interpretación de los espectros de masas experimentales**, prestando especial atención a la localización de *clusters* característicos de la presencia de átomos de Cl o Br.

En algunos casos, además de recurrir a la justificación de los iones experimentales, también se reforzó la identificación tentativa de los fotoproductos teniendo en cuenta las similitudes (y diferencias) entre los espectros de masas de dichos fotoproductos y los **espectros teóricos de compuestos estructuralmente relacionados**. Por ejemplo, el espectro de masas del 3-metilbut-2-enoato de 4-benciloxifenilo fue muy útil en el proceso de identificación de P 11 (Figura IV.4.11).

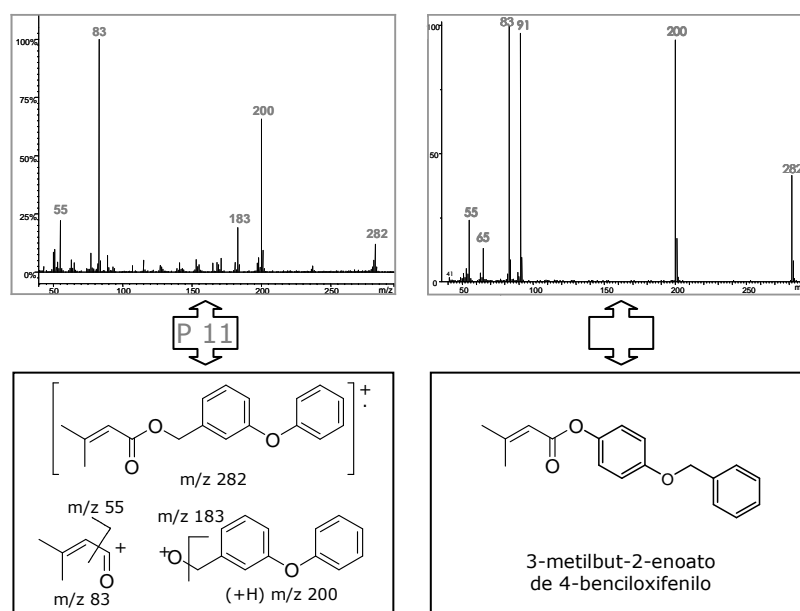


Figura IV.4.11 Espectro de masas y justificación de iones experimentales de P 11, y espectro de masas teórico de su isómero 3-metilbut-2-enoato de 4-benciloxifenilo.

Otro ejemplo es el de los fotoproductos P 16 y P 17, ambos dibenzofuranos, cuyos espectros de masas experimentales presentan algunas semejanzas con el espectro de masas teórico del dibenzofurano (Figura IV.4.12).

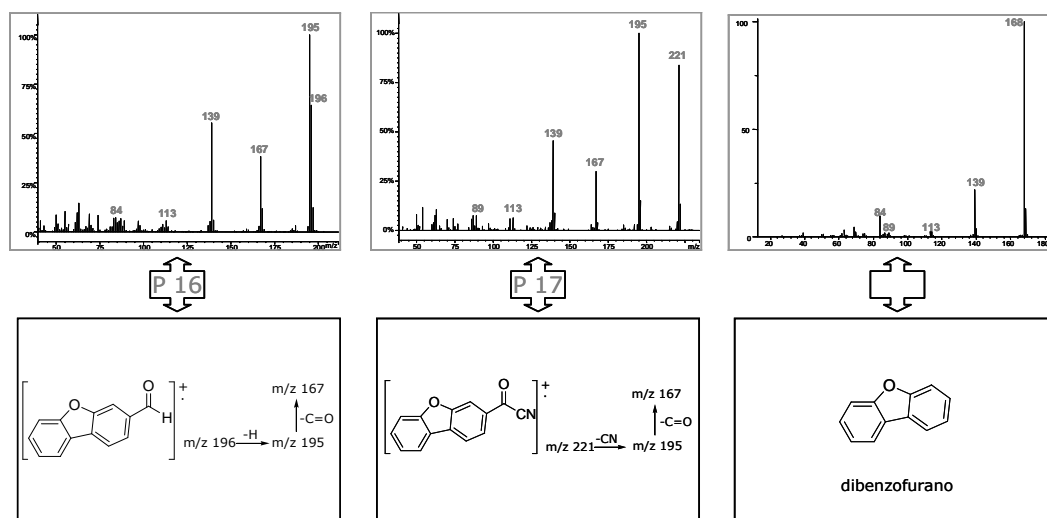


Figura IV.4.12 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de P 16 y P 17, y espectro de masas teórico del dibenzofurano.

En las Figuras IV.4.13 y IV.4.14, se muestran los **espectros de masas y la justificación de iones experimentales** del resto de fotoproductos identificados. Si se observan estos espectros con detenimiento se puede apreciar que fotoproductos equivalentes procedentes de diferentes piretroides, como por ejemplo los 3,3-dimetilacrilatos (P 6, P 11 y P 18) o los fotoproductos decarboxilados (P 19 y P 22), mostraron **patrones de fragmentación similares**, hecho que también resultó de gran ayuda durante el proceso identificativo. Además, para el caso de P 14, también se dispuso de datos espectrales consultados en la bibliografía [2].

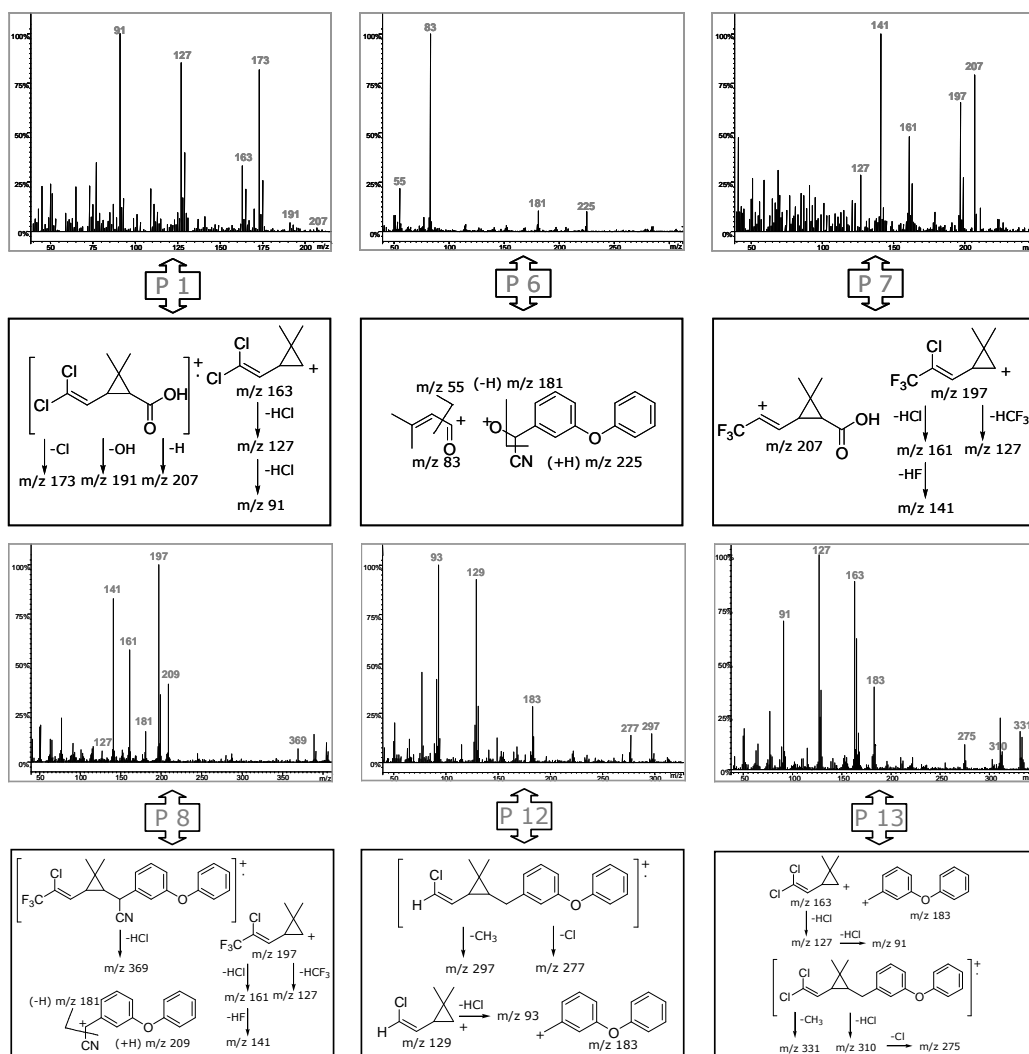


Figura IV.4.13 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de P 1, P 6, P 7, P 8, P 12 y P 13.

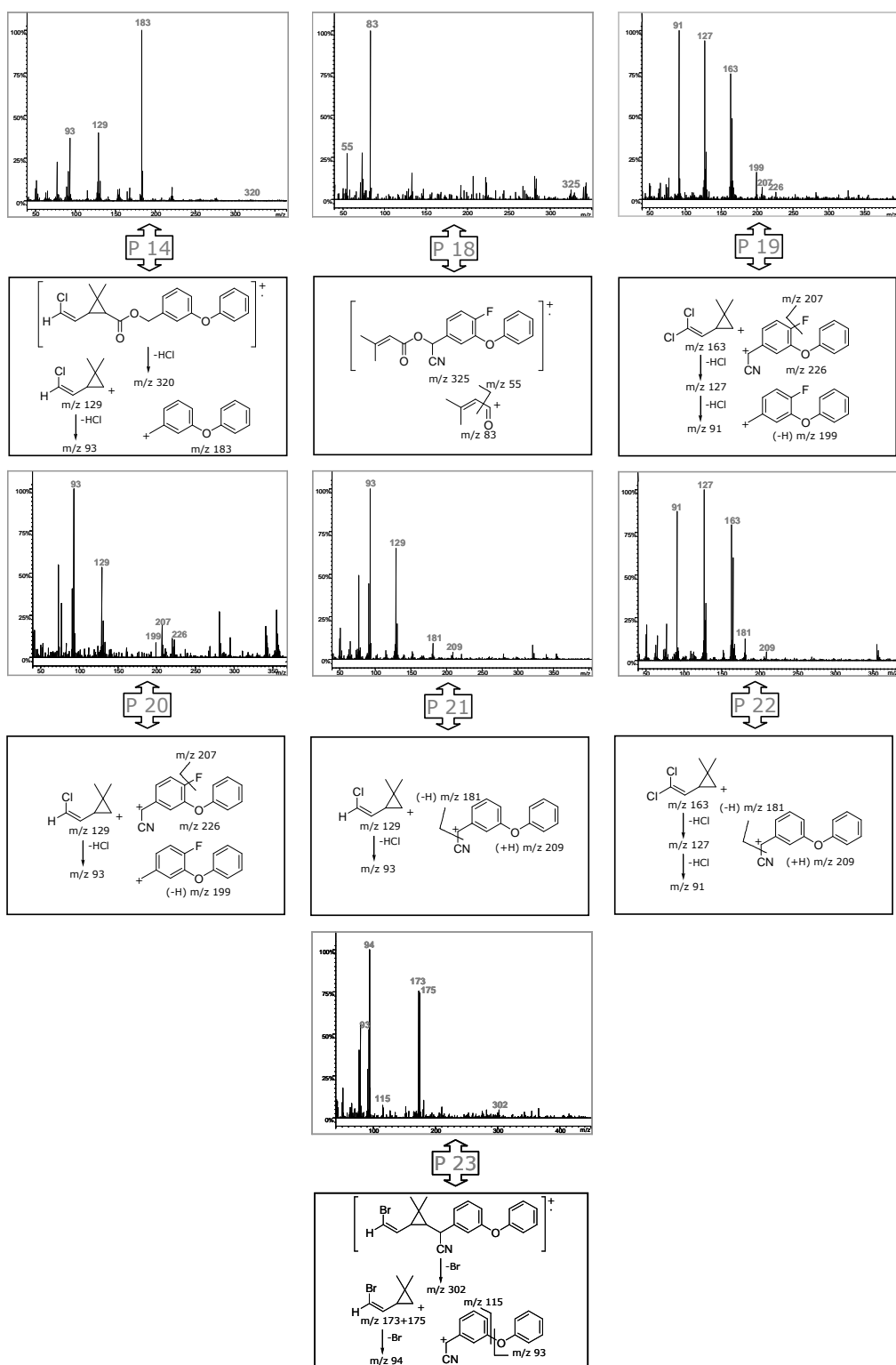


Figura IV.4.14 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de P 14, P 18, P 19, P 20, P 21, P 22 y P 23.

En los siguientes apartados se discutirán con más detalle los fotoproductos identificados para cada uno de los piretroides estudiados, así como las correspondientes rutas de fotodegradación.

4.2.3.1 Fotodegradación de la λ -cihalotrina

Se han propuesto **cinco** compuestos como fotoproductos de la **λ -cihalotrina**: P 2, P 4, P 5, P 7 y P 8, tres de los cuales (P 5, P 7 y P 8) ya habían sido identificados por otros autores [9, 10, 11].

En primer lugar, la **ruptura del enlace éster** de este piretroide puede dar lugar a la formación del fotoproducto **P 7** que fue tentativamente identificado como el ácido 3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico.

Por otro lado, como consecuencia de la **ruptura del enlace éster y pérdida del grupo ciano o hidroxilo** se pueden generar el (3-fenoxifenil)metanol (**P 4**) o el 3-fenoxifenil)acetonitrilo (**P 5**), respectivamente. Aunque P 5 también se podría formar directamente por ruptura del enlace C $_{\alpha}$ -O del piretroide de partida o por ruptura del correspondiente enlace C-C del fotoproducto P 8. A su vez, el fotoproducto **P2**, identificado tentativamente como 1-metil-3-fenoxibenceno, se podría obtener como consecuencia de la **pérdida del grupo hidroxilo y del grupo ciano** de los fotoproductos P 4 y P 5, respectivamente.

Finalmente, la **pérdida de CO₂** de la λ -cihalotrina puede dar lugar al fotoproducto **P 8**, que se identificó tentativamente como [3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo.

Sobre la base de los fotoproductos de la λ -cihalotrina que han sido identificados tentativamente, se han propuesto las **rutas de fotodegradación** mostradas en la Figura IV.4.15.

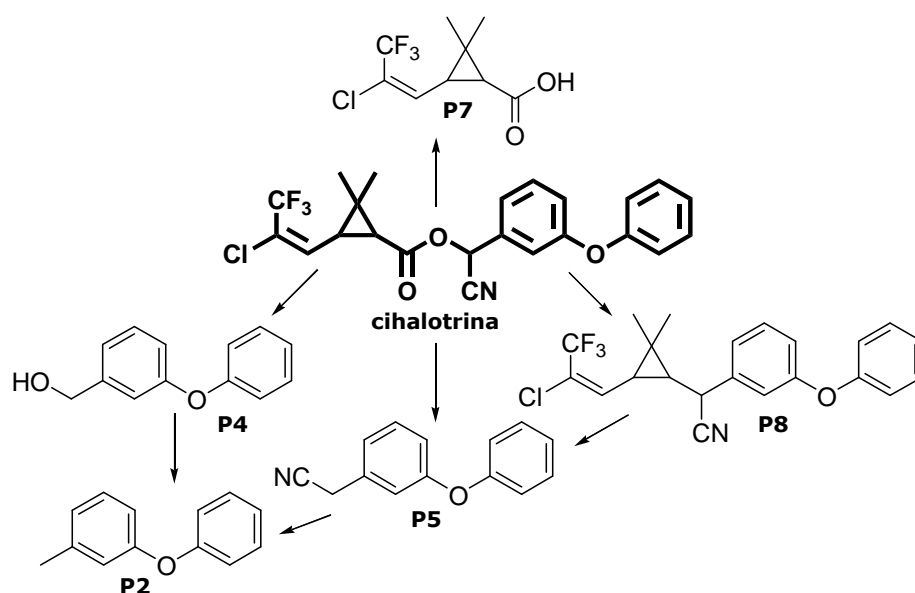


Figura IV.4.15 Rutas de fotodegradación propuestas para la λ -cihalotrina.

En la Figura IV.4.16 se superponen los cromatogramas obtenidos para la fibra sin exponer y a diferentes tiempos de irradiación, en los que se puede apreciar la formación y posterior fotodegradación del fotoproducto P 7. Además, registrando las variaciones en las alturas de pico para dicho fotoproducto se obtuvo la correspondiente **cinética de fotoformación-fotodegradación**. Es importante aclarar que estas curvas cinéticas siempre se deben interpretar con cautela puesto que un fotoproducto se puede generar y fotodegradar simultáneamente.

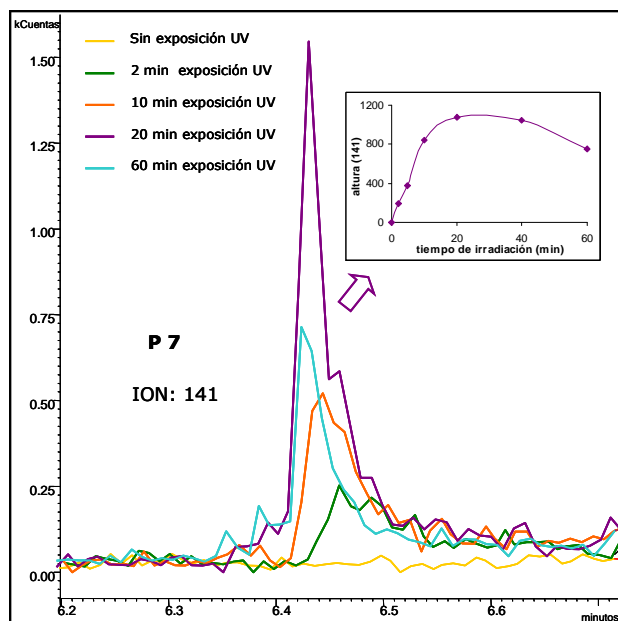


Figura IV.4.16 Cromatogramas por ion del fotoproducto P 7 sin irradiar y a diferentes tiempos de irradiación y cinética de fotoformación-fotodegradación.

4.2.3.2 Fotodegradación de la permetrina

Se han propuesto **once** compuestos como fotoproductos de la permetrina: P 1-P 4 y P 9-P 15. En estudios previos, P 1, P 3, P 4, P 10, P 11, P 14 y P 15 ya habían sido propuestos como productos de la fotodegradación de este piretroide [2, 12].

En primer lugar, el fotoproducto **P 1** se identificó tentativamente como el ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico, es decir, el ácido carboxílico que se formaría como consecuencia de la **ruptura del enlace éster** de la permetrina. Del mismo modo, el (3-fenoxifenil)metanol (**P 4**), se puede generar a partir de la **ruptura del enlace éster** de la permetrina, o también a partir de otros fotoproductos de este piretroide que conservan el enlace éster (P 11, P 14, P 15). La pérdida del grupo hidroxilo de P 4 daría lugar al fotoproducto **P 2**, el cual también se podría generar por ruptura del correspondiente enlace C-C de los fotoproductos P 12 y P 13 o del enlace C $_{\alpha}$ -O de la permetrina o de los fotoproductos P 11, P 14 y P 15. Además, la **cloración** de P 2 podría generar 1-(clorometil)-3-fenoxibenceno (**P 9**).

Por otro lado, la oxidación de P 4 puede dar lugar al fotoproducto **P 3** de la permetrina, el 3-fenoxibenzaldehído. A su vez, la oxidación de P 3 podría generar el ácido 3-fenoxibenzoico (**P 10**).

El fotoproducto **P 11** de la permetrina se identificó tentativamente como el 3-metilbut-2-enoato de 3-fenoxibencilo. Este **3,3-dimetilacrilato** podría generarse por desproporción del 1,3-diradical resultado de la ruptura del enlace 1,3 del anillo ciclopropano.

Se propuso al 1-[3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil]metil]-3-fenoxibenceno (**P 13**) como fotoproducto de la permetrina. Este compuesto se obtendría como consecuencia de la **decarboxilación** del piretroide de partida. Por otro lado, la **dehalogenación reductiva** de la permetrina puede conducir a la formación del fotoproducto **P 14** (3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 3-fenoxibencilo). A su vez, el fotoproducto **P 12** (1-[3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropil]metil]-3-fenoxibenceno) se podría generar bien a partir de la decarboxilación de P 14, bien a partir de la pérdida de un átomo de cloro por parte de P 13.

Finalmente, y tal y como ya se ha mencionado en el **Apartado 4.2.2.1**, la **isomerización cis-trans** (**P 15**) parece ser otra de las rutas de fotodegradación de la permetrina.

Sobre la base de los fotoproductos de la permetrina que han sido identificados tentativamente, se propusieron las **rutas de fotodegradación** mostradas en la Figura IV.4.17.

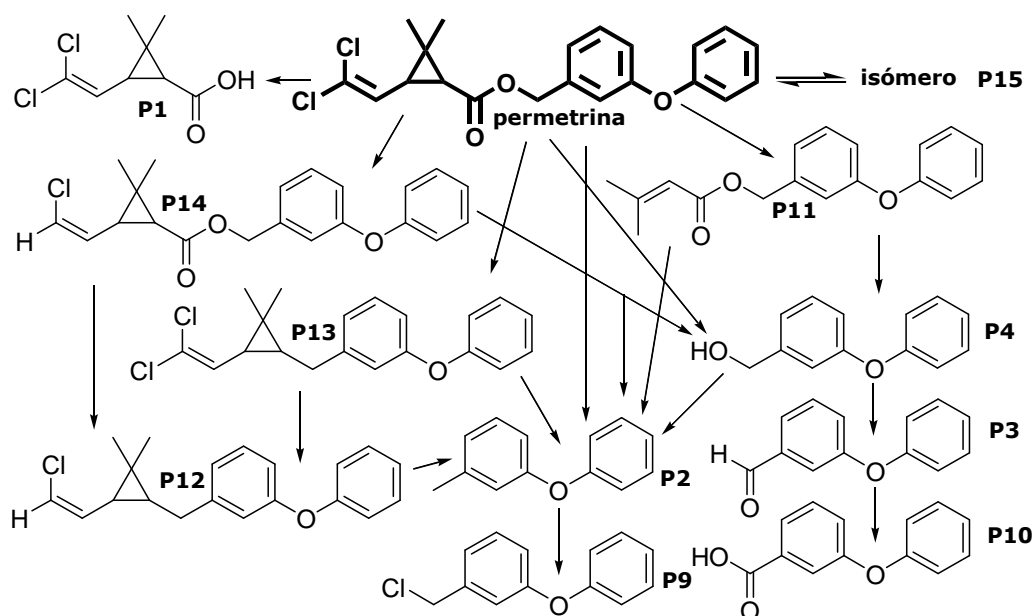


Figura IV.4.17 Rutas de fotodegradación propuestas para la permetrina.

En la Figura IV.4.18 se superponen los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de exposición de la fibra a la radiación UV. En ellos puede observarse la formación y posterior degradación de los fotoproductos P 12 y P 13 de la permetrina. En la figura también se han incluido las correspondientes cinéticas.

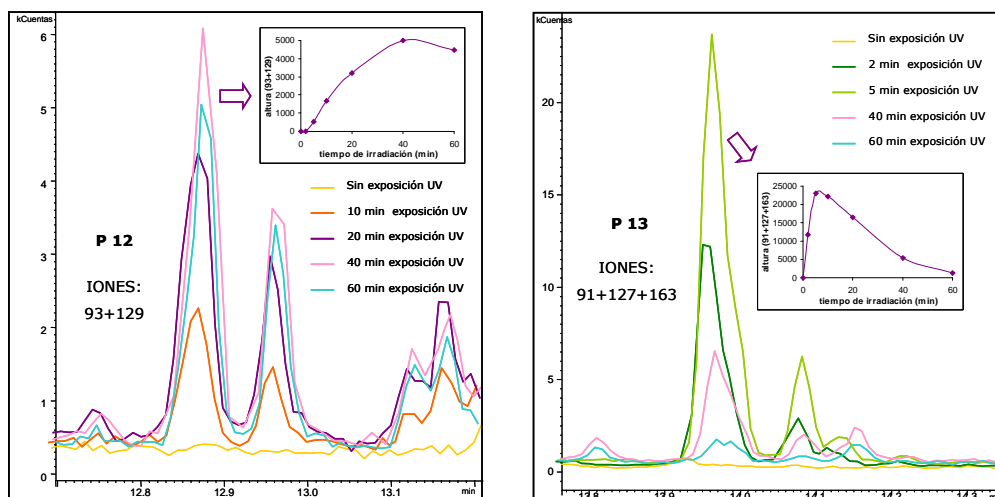


Figura IV.4.18 Cromatogramas por ion de los fotoproductos P 12 y P 13 sin irradiar y a diferentes tiempos de irradiación y cinéticas de fotoformación-fotodegradación.

De la Figura IV.4.18 se deduce que P 13 (permetrina- CO_2) ya se empieza a formar durante los primeros minutos de irradiación y alcanza su máximo rápidamente, aproximadamente tras 5 minutos de irradiación, tiempo tras el cual la altura de pico comienza a disminuir como consecuencia de su propia fotodegradación, mientras que P 12 (permetrina- CO_2 -Cl) tarda más tiempo en empezar a formarse (más de 5 minutos), hecho que se podría atribuir a que este compuesto no se estuviese formando directamente a partir de la permetrina, si no a partir de P 13 (o de P 14).

4.2.3.3 Fotodegradación de la ciflutrina

Se han propuesto **ocho** compuestos como fotoproductos de la ciflutrina: P 1, P 3, P 5, P 16-P 20.

En primer lugar, como consecuencia de la **ruptura del enlace éster**, se detectó la generación del ácido ciclopropanocarboxílico correspondiente, es decir, **P 1**. En lo que respecta al fotoproducto **P 3**, su identidad no está del todo clara. Y es que, a diferencia de lo que ocurría para la permetrina, el 3-fenoxibenzaldehído (ver espectros de masas P 3 en Figura IV.4.9) no es la única opción posible, dada la enorme semejanza entre los espectros de masas teóricos de este compuesto y del hidroxí(3-

fenoxifenil)acetonitrilo (ver espectros de masas P3* en Figura IV.4.9), que también es un posible fotoproducto de la ciflutrina. En definitiva, en el caso de la ciflutrina, P 3 podría tratarse del 3-fenoxibenzaldehído, del hidroxil(3-fenoxifenil)acetonitrilo, o de ambos.

Por su parte, **P 5** ((3-fenoxifenil)acetonitrilo) podría formarse a partir del hidroxil(3-fenoxifenil)acetonitrilo (P3*), o también por ruptura del enlace C_α-O de la ciflutrina o de P 18, o del correspondiente enlace C-C de P 19 y P 20, y pérdida del átomo de flúor.

Los fotoproductos **P 16** y **P 17** se identificaron tentativamente como dibenzo[b,d]furan-3-carbaldehído y dibenzo[b,d]furan-3-il(oxo)acetonitrilo, respectivamente. P 17 podría formarse por oxidación y posterior fotodefluoración de un hipotético alcohol α-ciano-3-fenoxi-4-fluorobencílico intermedio generado por **ruptura del enlace éster** de la ciflutrina y/o del fotoproducto P 18. Por otra parte, P 16 se podría obtener por **pérdida del grupo ciano** de P 17.

Para este piretroide también se detectó la formación de un **3,3-dimetilacrilato**, concretamente el 3-metilbut-2-enoato de α-ciano-3-fenoxi-4-fluorobencilo (**P 18**).

De nuevo, la **decarboxilación** fue una de las rutas propuestas para la ciflutrina, puesto que el fotoproducto **P 19** se identificó tentativamente como [3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](4-fluoro-3-fenoxifenil)acetonitrilo. Además, la **decloración reductiva** de P 19 podría generar **P 20**, [3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](4-fluoro-3-fenoxifenil)acetonitrilo.

A partir de los fotoproductos de la ciflutrina identificados tentativamente se propusieron las **rutas de fotodegradación** mostradas en la Figura IV.4.19.

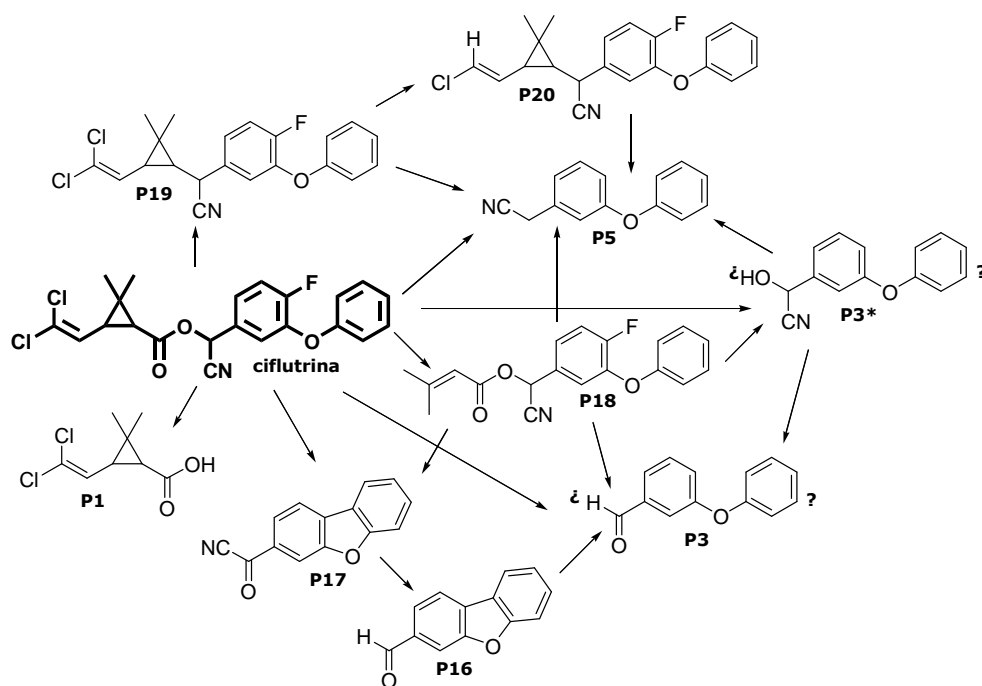


Figura IV.4.19 Rutas de fotodegradación propuestas para la ciflutrina.

En la Figura IV.4.20 se muestra la superposición de los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de irradiación UV y las cinéticas de los fotoproductos P 16 y P 17 de la ciflutrina.

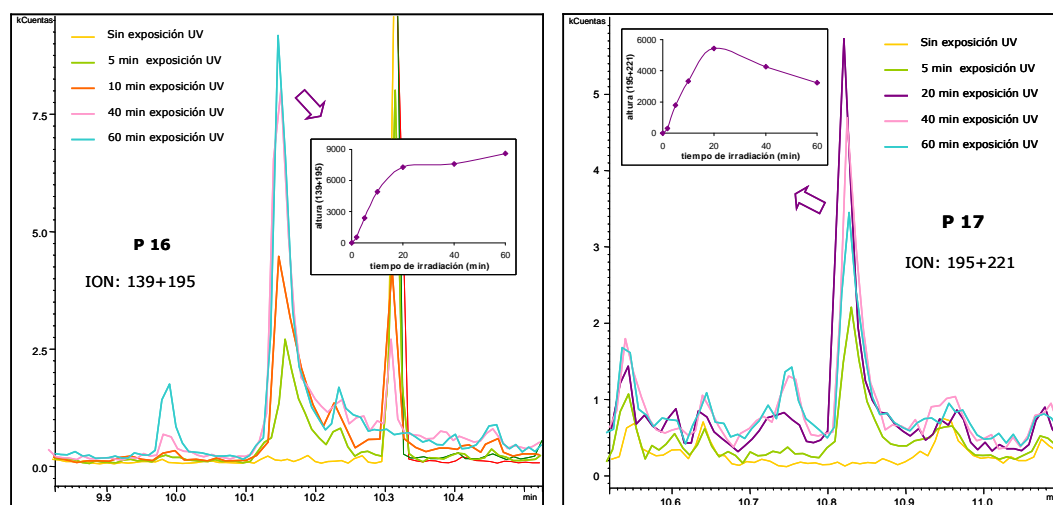


Figura IV.4.20 Cromatogramas por ion de los fotoproductos P 16 y P 17 sin irradiar y a diferentes tiempos de irradiación y cinéticas de fotoformación-fotodegradación.

4.2.3.4 Fotodegradación de la cipermetrina

Se han propuesto **7** compuestos como fotoproductos de la cipermetrina: P 1, P 2, P 4-P 6, P 21 y P 22. Cuatro de estos compuestos (P 1, P 5, P 6 y P 22) ya habían sido sugeridos por otros autores como fotoproductos de este insecticida [5, 9, 13-16].

De nuevo, **P 1** se pudo generar como consecuencia de **la ruptura del enlace éster** de este piretroide diclorovinílico. **P 4** ((3-fenoxifenil)metanol) podría formarse a partir de la cipermetrina y/o del fotoproducto P 6 a través de la ruptura del enlace éster y de la pérdida del grupo ciano. Por otro lado, **P 5** ((3-fenoxifenil)acetonitrilo) quizás se genere por ruptura del enlace éster y pérdida del grupo hidroxilo de la cipermetrina o de P 6, o también por ruptura directa del enlace C_α-O de dichos compuestos. Aunque también se podría formar como consecuencia de la ruptura del correspondiente enlace C-C de P 21 y P 22. Por su parte, **P 2** podría obtenerse por degradación de P 4 y/o P 5.

En lo que respecta al fotoproducto **P 6**, fue identificado tentativamente como **3,3-dimetilacrilato** de α -ciano-3-fenoxibencilo.

De nuevo, se detectó la **pérdida de CO₂** como ruta de fotodegradación, puesto que se propuso al [3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo como fotoproducto de la cipermetrina (**P 22**). A su vez, **P 21** se identificó como [3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo, el cual probablemente se genere por **decloración reductiva** de P 22.

A partir de los fotoproductos de la cipermetrina identificados tentativamente se propusieron las **rutas de fotodegradación** mostradas en la Figura IV.4.21.

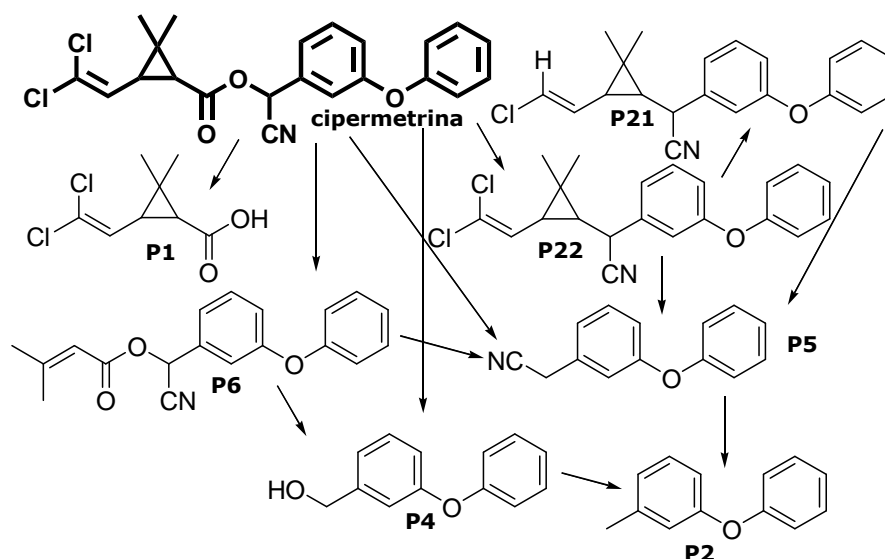


Figura IV.4.21 Rutas de fotodegradación propuestas para la cipermetrina.

En la Figura IV.4.22 se superponen los cromatogramas de los fotoproductos P 21 y P 22 y también se incluyen las correspondientes cinéticas de fotoformación-fotodegradación.

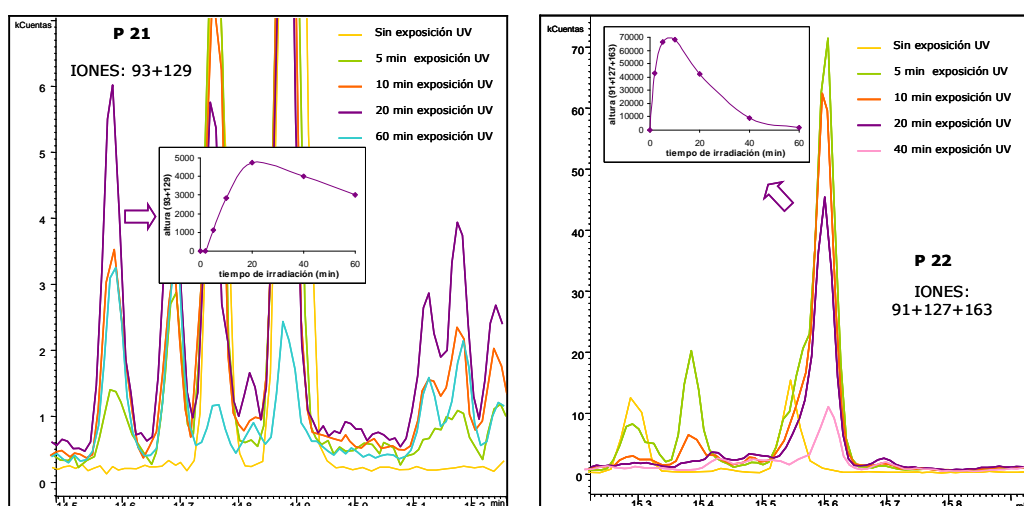


Figura IV.4.22 Cromatogramas por ion de los fotoproductos P 21 y P 22 sin irradiar y a diferentes tiempos de irradiación y cinéticas de fotoformación-fotodegradación.

Las cinéticas de P 21 y P 22 mostradas en la Figura IV.4.21 son consistentes con la suposición de que una de las rutas de degradación de P 22 podría ser la pérdida de un átomo de cloro para formar P 21, puesto que el descenso de la altura de pico de P 22 a partir de los 10 min de exposición (después de un incremento muy rápido en la respuesta durante los primeros minutos de irradiación) coincide con el incremento de la altura de pico de P 21 (de formación más tardía) para alcanzar su máximo a los 20 min.

4.2.3.5 Fotodegradación de la deltametrina

Se propusieron un total de **6** compuestos como fotoproductos de la deltametrina: P 3- P 6, P 23 y P 24.

En lo que se refiere al fotoproducto **P 3**, ocurre lo mismo que se comentó para la ciflutrina: podría tratarse del hidroxí(3-fenoxifenil)acetonitrilo, del 3-fenoxibenzaldehído, o de ambos. De hecho los dos compuestos han sido identificados como fotoproductos de la deltametrina en estudios previos [17, 18]. También se propuso al (3-fenoxifenil)metanol (**P 4**) como fotoproducto, el cual seguramente se genere a partir de la deltametrina o de P 6 por **ruptura del enlace éster y pérdida del grupo ciano**. Por otra parte, también se identificó como fotoproducto al (3-fenoxifenil)acetonitrilo (**P 5**), el cual se podría generar por pérdida del grupo hidroxilo del hidroxí(3-fenoxifenil)acetonitrilo (¿P3*?), por ruptura del enlace C_α-O del propio piretroide y/o del fotoproducto **P 6** (3-metilbut-2-enoato de α-ciano-3-fenoxibencilo) y/o por ruptura del correspondiente enlace C-C de P 23. Tanto P 5 como P 6 ya habían sido detectados con anterioridad [17, 18].

Además, se observó que los fotoproductos **P 24** poseían el mismo espectro de masas que la deltametrina, por lo que fueron identificados tentativamente como **isómeros** de dicho piretroide, tal y como ya habían observado Ruzo y col. [17, 18] y Maguire [19].

Finalmente, el fotoproducto **P 23** se identificó como [3-(2-bromovinil)-2,2-dimetilciclopropil](3-fenoxifenil)acetonitrilo, es decir, el producto resultado de la **decarboxilación y pérdida de un átomo de Br** por parte de la deltametrina.

En la Figura IV.4.23 se muestran las **rutas de fotodegradación** propuestas para la deltametrina.

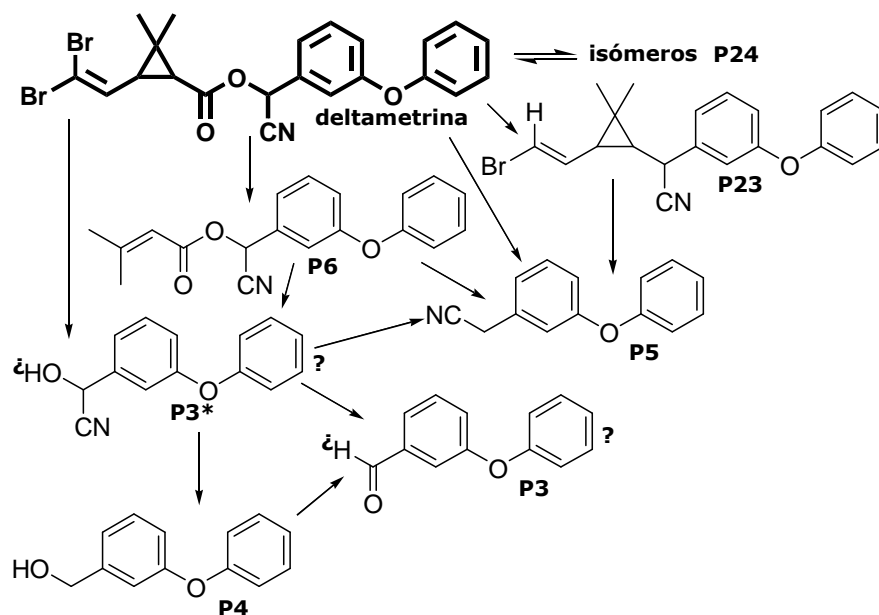


Figura IV.4.23 Rutas de fotodegradación propuestas para la deltametrina.

4.2.4 FOTO-SPME UTILIZANDO LUZ SOLAR NATURAL

Se realizaron algunas pruebas de fotodegradación de la λ -cihalotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina y deltametrina mediante **foto-SPME** y empleando como fuente de irradiación **luz solar natural**. La fibra de PDMS se expuso a la luz solar durante 16 h en dos días consecutivos; transcurrido ese tiempo se procedió a su análisis mediante GC-MS. Además, se llevaron a cabo experimentos en idénticas condiciones pero protegiendo la fibra de la luz del sol (test de oscuridad). Los resultados obtenidos para la foto-SPME con luz solar, el test de oscuridad y la SPME control se han representado en la Figura IV.4.24.

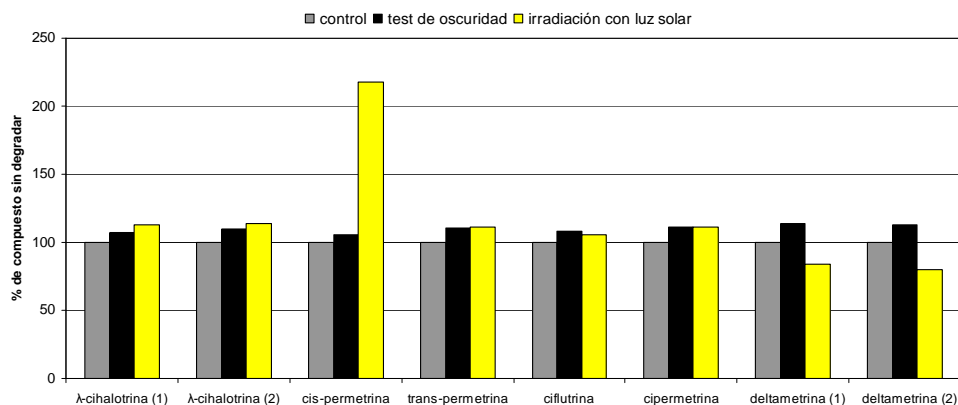


Figura IV.4.24 Fotodegradación de los piretroides estudiados tras 16 h de irradiación con luz solar.

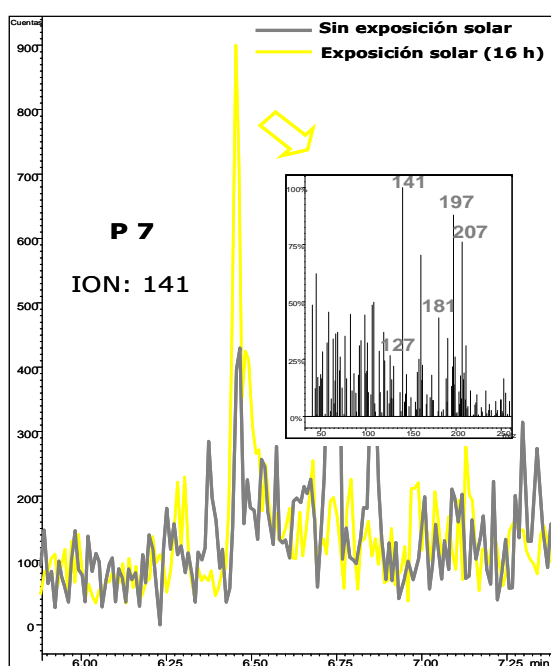


Figura IV.4.25 Cromatogramas obtenidos en la foto-SPME sin exposición solar y después de 16 h de irradiación solar y espectro de masas de P 7.

Tras 16 h de irradiación, se evaluó la **degradación de la deltametrina** en un 80% y, de nuevo, se demostró la mayor fotorreactividad de este piretroide bromo-sustituido en comparación con aquéllos cloro-sustituidos. De hecho, a pesar de que se observó la **fotoisomerización *cis-trans* de la permetrina** (ver incremento de la respuesta del isómero *cis* en la Figura IV.4.24) y la formación de otros fotoproductos (como por ejemplo el P 7 de la λ-cihalotrina, Figura IV.4.25), no se observó un descenso apreciable en la señal de la λ-cihalotrina, cipermetrina, ciflutrina y permetrina (Figura IV.4.24). Estos resultados no resultan extraños si se tiene en

cuenta que, en estudios llevados a cabo por otros autores acerca de la fotodegradación de estos piretroides bajo luz solar, se estimaron para estos compuestos tiempos de vida media del orden de varios días [10-12, 14, 20, 21].

Este experimento aislado pone claramente de manifiesto la utilidad de la foto-SPME como técnica de campo en estudios de irradiación con luz solar natural.

4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PIRETROIDES DE USO DOMÉSTICO Y BUTÓXIDO DE PIPERONILO

De nuevo, algunos de los productos comerciales a partir de los cuales se prepararon las disoluciones de trabajo de los piretroides contienen **mezclas de isómeros**. De manera que bajo las condiciones instrumentales indicadas en la Tabla IV.4.1, la fenotrina presenta dos picos perfectamente resueltos y, por lo tanto, se cuantificaron individualmente; mientras que los picos obtenidos para la empentrina, la cifenotrina y la aletrina se solapan parcialmente, por lo que se cuantificaron conjuntamente. En la Tabla IV.4.7 se incluyen los **tiempos de retención** e **iones de cuantificación** de los compuestos investigados en este estudio. Los correspondientes **espectros de masas** experimentales y teóricos (en los casos en los que éstos están disponibles en la librería) se muestran en la Figura IV.4.26.

Tabla IV.4.7 Tiempos de retención e iones de cuantificación de los piretroides estudiados.

Compuesto	t _r (min)	Iones de cuantificación
Empentrina	10,29	123
Transflutrina	11,42	163
Aletrina	12,63	123
Fenotrina (1)	16,96	123+183
Fenotrina (2)	17,12	123+183
Cifenotrina	18,38-18,56	123
PBO	15,68	176

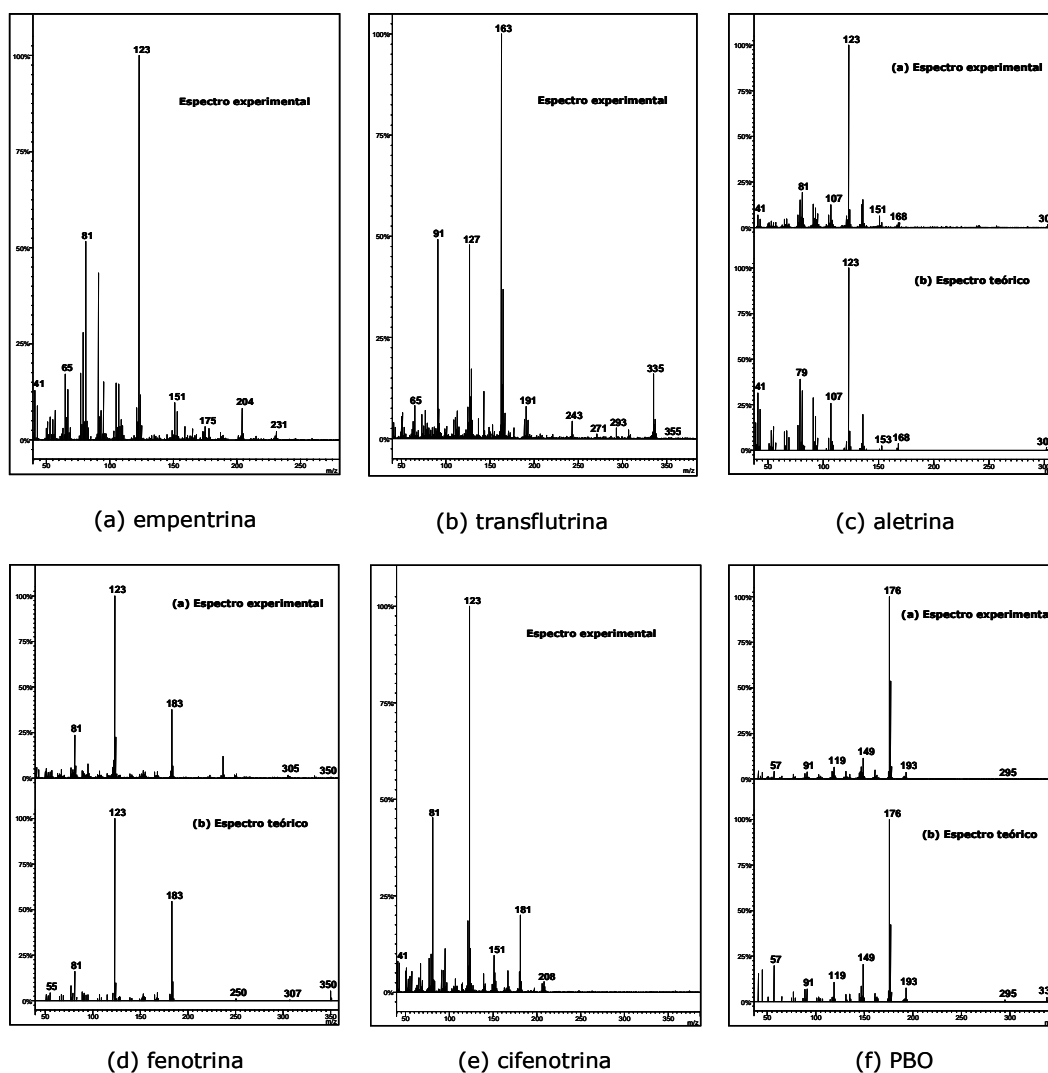


Figura IV.4.26 Espectros de masas experimentales y teóricos de los compuestos estudiados: (a) empenrina, (b) transflutrina, (c) aletrina, (d) fenotrina, (e) cifenotrina, (f) PBO.

4.3.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

4.3.1.1 Espectros UV

Los **espectros UV** obtenidos para los compuestos estudiados (10 ng mL^{-1}) fueron muy similares entre sí, con valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de **264 nm**. Se observó que todos los analitos

absorben radiación al máximo de emisión de la lámpara de trabajo (**254 nm**) y, a partir de los datos espectrales obtenidos, se calcularon los **coeficientes de absorción** molar a esta longitud de onda (Tabla IV.4.8). A la vista de los resultados obtenidos, a la longitud de onda de trabajo, sería de esperar que la cifenotrina se fotodegradase más rápidamente que los otros analitos, mientras que la empentrina sería el más fotoestable de todos ellos. En cuanto a los restantes piretroides, estos presentan un comportamiento intermedio con valores de absortividad análogos.

Tabla IV.4.8 Coeficientes de absorción molar a 254 nm de los compuestos estudiados.

Compuesto	ϵ_{254} (L mol⁻¹ cm⁻¹)
Cifenotrina	$7,32 \cdot 10^6$
Transflutrina	$6,84 \cdot 10^6$
Aletrina	$6,41 \cdot 10^6$
Fenotrina	$6,20 \cdot 10^6$
Empentrina	$5,13 \cdot 10^6$
PBO	$7,01 \cdot 10^6$

4.3.1.2 Test de oscuridad

Se llevó a cabo el test de oscuridad para los compuestos investigados de la misma manera que se ha indicado en el **Apartado 4.2.1.2**. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura IV.4.27, demostraron que la **fotodegradación** es el único proceso que causa la disminución de respuesta de los analitos después de ser irradiados con luz UV.

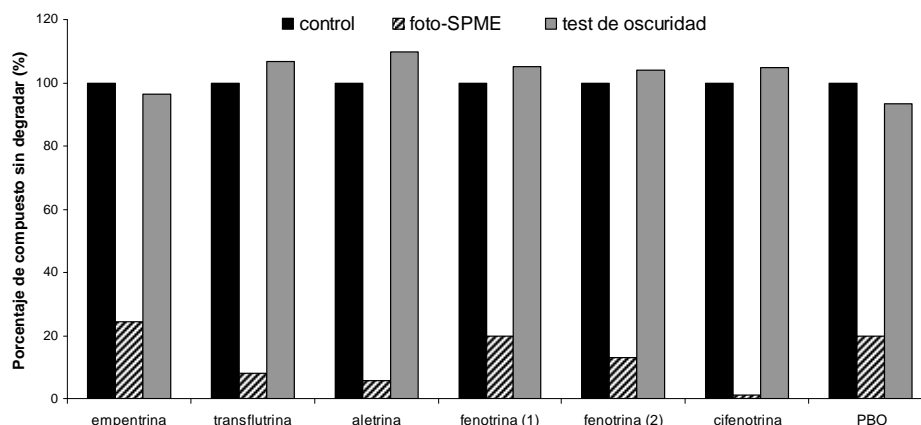


Figura IV.4.27 Resultados del test de oscuridad y de la foto-SPME (40 min) para los compuestos estudiados comparados con los obtenidos en el experimento control.

4.3.2 FOTO-SPME

4.3.2.1 Influencia del tiempo de irradiación

Siguiendo exactamente el mismo procedimiento señalado en el **Apartado 4.2.2.1**, se estudió el efecto del tiempo de exposición de la fibra a la luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$, **18 W**) en la respuesta analítica de los compuestos investigados. En la Figura IV.4.28 se han representado los valores medios de los duplicados realizados.

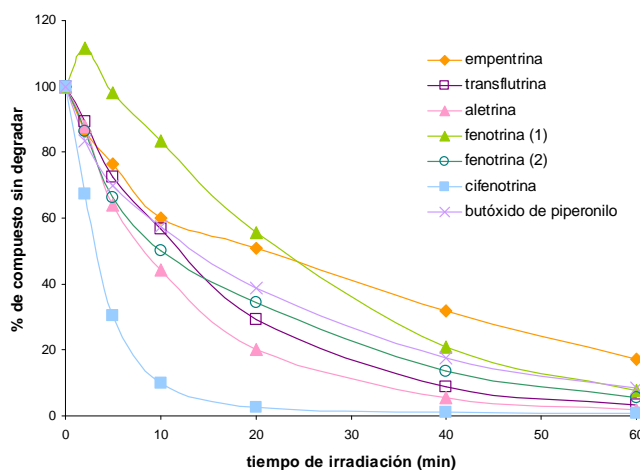


Figura IV.4.28 Cinéticas de la fotodegradación en fibra de los compuestos estudiados.

Las **cinéticas de fotodegradación** obtenidas (Figura IV.4.28) muestran que la fotodegradación de la cifenotrina es muy rápida, con pérdidas de más de un 90% tras

20 min de exposición UV, mientras que la fotodegradación de la aletrina, la fenotrina y el PBO es más lenta, siendo la empentrina el más fotoestable de los compuestos estudiados, con una degradación todavía inferior al 50% transcurrido el mismo tiempo de irradiación.

El incremento observado en el área de pico de la fenotrina (1) durante los primeros minutos de exposición UV se puede atribuir a la fotoisomerización de la fenotrina (2); esta ruta fotolítica ya había sido propuesta para este piretroide por Ruza y col. [22].

En la Figura IV.4.29, que se muestra a continuación, se superponen los **cromatogramas** obtenidos a diferentes tiempos de irradiación. En ellos puede apreciarse la desaparición de los analitos al exponer la fibra a la radiación UV.

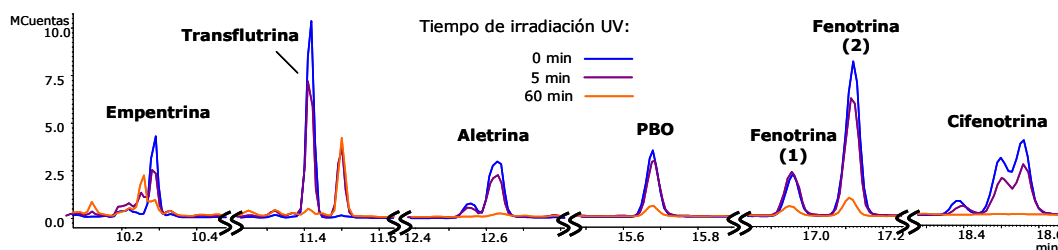


Figura IV.4.29 Superposición de los cromatogramas obtenidos para los compuestos estudiados en los experimentos de foto-SPME correspondientes a 0, 5 y 60 min de irradiación UV (18 W).

4.3.2.2 Comportamiento cinético de primer orden

Todos los compuestos investigados mostraron un **comportamiento cinético de primer orden** tal y como se dedujo de la correlación lineal observada entre el logaritmo neperiano del porcentaje de compuesto sin degradar y el tiempo de irradiación (Figura IV.4.30). Las constantes de velocidad aparentes de primer orden (k_{ap}) y los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) estimados para cada compuesto, junto con los coeficientes de regresión, se han incluido en la Tabla IV.4.9. Draper [23] también observó este orden de reacción para la fotodegradación del PBO.

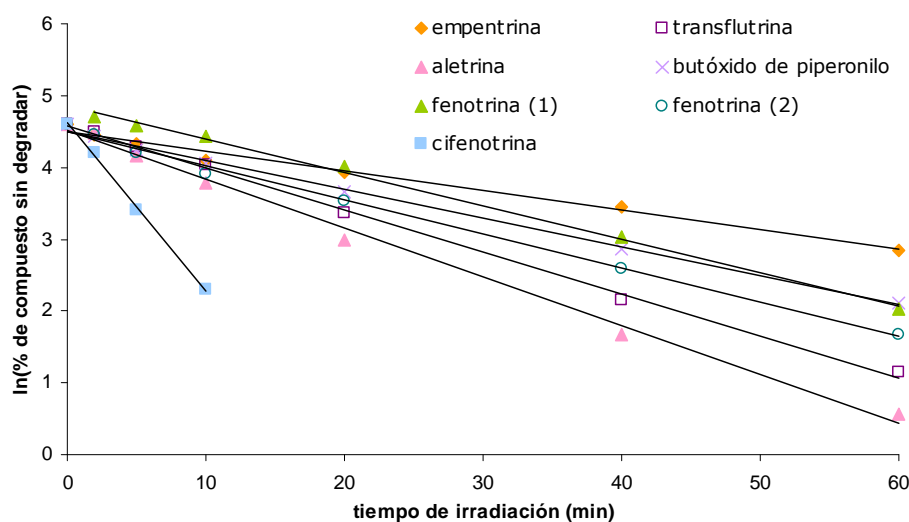


Figura IV.4.30 Demostración del comportamiento cinético de primer orden para la fotodegradación en fibra de los compuestos estudiados.

Tabla 4.9 Parámetros cinéticos de los compuestos estudiados.

Compuesto	Rango evaluado (min)	R ²	k _{ap} (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)
Cifenotrina	0-10	0,9983	0,234	2,96
Aletrina	0-60	0,9946	0,0679	10,2
Transflutrina	0-60	0,9985	0,0585	11,8
Fenotrina (2)	0-60	0,9954	0,0475	14,6
Fenotrina (1)	2-60	0,9969	0,0465	14,9
Empentrina	0-60	0,9859	0,0274	25,3
Butóxido de piperonilo	0-60	0,9962	0,0403	17,2

De acuerdo con estos resultados, el **orden de fotoestabilidad** de los compuestos investigados bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo es el siguiente: empentrina > PBO > fenotrina (1) ~ fenotrina (2) > transflutrina > aletrina > cifenotrina. La mayor fotoestabilidad de la empentrina se esperaba de los datos espectrales obtenidos a 254 nm (Apartado 4.3.1.1). Del mismo modo, la mayor rapidez de la fotodegradación de la cifenotrina es consistente con su mayor coeficiente de absorción molar a la longitud de onda de trabajo.

4.3.3 IDENTIFICACIÓN DE FOTOPRODUCTOS

La exposición de los compuestos estudiados a la luz UV condujo a la formación de un **gran número de fotoproductos**, algunos de los cuales se pudieron identificar tentativamente sobre la base de sus espectros de masas. Para ello, se compararon los **espectros de masas experimentales** y los encontrados en la **librería de espectros**. Sin embargo, puesto que los espectros de masas de un gran número de los fotoproductos de los compuestos estudiados no aparecen en la librería, de nuevo se tuvo que recurrir al **análisis de los espectros de masas experimentales** (*clusters* de Cl, pérdidas de fragmentos característicos, iones moleculares) y a la consulta de la bibliografía disponible acerca de la fotoquímica de los piretroides y del PBO para así tratar de esclarecer la identidad de los productos de su fotodegradación. Es importante enfatizar que no se han encontrado estudios previos acerca de la fotodegradación de la empenrina y la cifenotrina, y que la información disponible acerca de la fotoquímica de la transflutrina es muy escasa.

Como en el estudio anterior, se realizaron una serie de experimentos en los que se investigó **individualmente** la fotodegradación en fibra de cada compuesto para así facilitar la identificación de los fotoproductos. Las estructuras de los fotoproductos identificados, así como los tiempos de retención e iones de cuantificación se han incluido en la **Tabla IV.4.10**. Además de los fotoproductos de la empenrina y de la cifenotrina, de cuya fotodegradación no se han encontrado trabajos previos, algunos de los fotoproductos identificados (F 2, F 5-F 8, F 10, F 15, F 17 y F 19) se proponen por primera vez en este estudio.

En lo que respecta a las **rutas de fotodegradación**, la isomerización, la ruptura del enlace éster y la formación de 3,3-dimetilacrilatos se observaron en todos los insecticidas estudiados. Además, se detectaron **fotoproductos comunes** a varios piretroides (F 1, F 2, F 16, F 18). Estos compuestos se han marcado en negro en la Tabla IV.4.10, mientras que los fotoproductos específicos de cada compuesto se han resaltado con distintos colores: empenrina (rosa), transflutrina (azul), aletrina (verde), fenotrina (violeta), cifenotrina (naranja) y PBO (marrón). Por otro lado, para algunos fotoproductos (F 4, F 7, F 8, F 10, F 11, F 14) se obtuvieron varios picos con

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

los mismos espectros de masas, y en estos casos se asumió que se habían generado **mezclas isoméricas**.

Tabla IV.4.10 Estructuras, tiempos de retención (t_r) e iones de cuantificación de los fotoproductos generados e identificados en la foto-SPME de los compuestos estudiados.

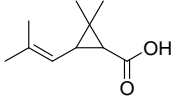
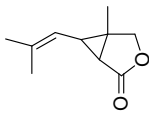
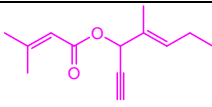
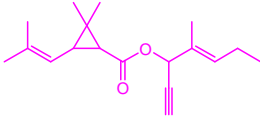
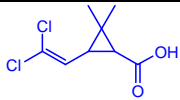
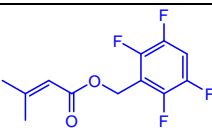
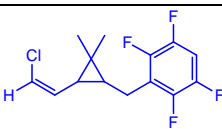
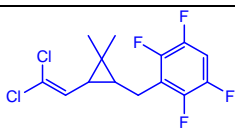
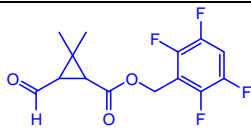
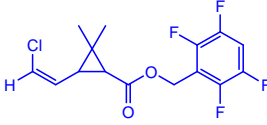
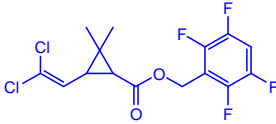
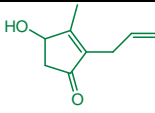
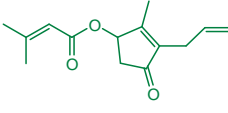
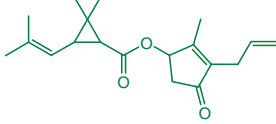
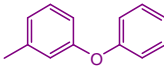
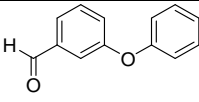
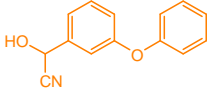
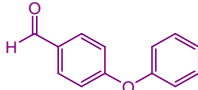
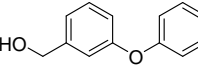
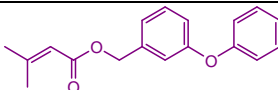
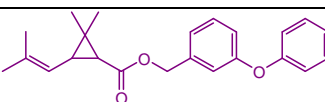
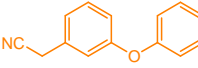
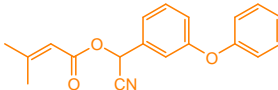
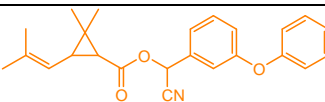

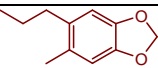
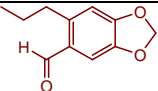
Código	Fotoproducto	Estructura	t_r (min)	Ion(es) de cuantificación
F 1	ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propenil)ciclopropanocarboxílico		7,14	81, 123
F 2	5-metil-6-(2-metilprop-1-en-1-il)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-ona		8,19	111
F 3	3-metilbut-2-enoato de 1-etinil-2-metilpent-2-en-1-ilo		8,37	83
F 4	2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-en-1-il)ciclopropanocarboxilato de 1-etinil-2-metilpent-2-en-1-ilo		10,05-10,41	123
F 5	ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico		8,36	91, 127, 173
F 6	3-metilbut-2-enoato de 2,3,5,6-tetrafluorobencilo		8,47	83, 163
F 7	3-{[3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropil]metil}-1,2,4,5-tetrafluorobenceno		8,96-9,04	93, 129
F 8	3-{[3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil]metil}-1,2,4,5-tetrafluorobenceno		9,21-9,84	91, 127, 163

Tabla IV.4.10 Estructuras, tiempos de retención (t_r) e iones de cuantificación de los fotoproductos generados e identificados en la foto-SPME de los compuestos estudiados, (continuación).

Código	Fotoproducto	Estructura	t_r (min)	Ion(es) de cuantificación
F 9	3-formil-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2,3,5,6-tetrafluorobencilo		10,07	97, 163
F 10	3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2,3,5,6-tetrafluorobencilo		10,71- 10,87	93, 163
F 11	3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2,3,5,6-tetrafluorobencilo		11,31- 11,51	163
F 12	4-hidroxi-3-metil-2-(2-propenil)-2-ciclopenten-1-ona		7,93	43, 109
F 13	3-metilbut-2-enoato de 3-alil-2-metil-4-oxociclopent-2-en-1-ilo		10,51	83, 134
F 14	2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-en-1-il)ciclopropanocarboxilato de 3-alil-2-metil-4-oxociclopent-2-en-1-ilo		12,87- 13,14	123
F 15	1-metil-3-fenoxibenceno		9,05	184
F 16	3-fenoxibenzaldehído		10,34	198
F 16*	hidroxi(3-fenoxifenil)acetoniitrilo		10,34	198

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

Tabla IV.4.10 Estructuras, tiempos de retención (t_r) e iones de cuantificación de los fotoproductos generados e identificados en la foto-SPME de los compuestos estudiados, (continuación).

Código	Fotoproducto	Estructura	t_r (min)	Ion(es) de cuantificación
F 17	4-fenoxibenzaldehído		10.59	197
F 18	(3-fenoxifenil)metanol		10.87	200
F 19	3-metilbut-2-enoato de 3-fenoxibencilo		13.96	83, 200
F 20	2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil)ciclopropanocarboxilato de 3-fenoxibencilo		16.97	123, 183
F 21	(3-fenoxifenil)acetonitrilo		11.46	209
F 22	3-metilbut-2-enoato de ciano(3-fenoxifenil)metilo		15.41	83
F 23	2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil)ciclopropanocarboxilato de α-ciano-3-fenoxibencilo		18.28	123
F 24	2-(2-butoxi)etanol		6.55	45, 57
F 25	5-metil-6-propil-1,3-benzodioxol		8.40	149, 178
F 26	6-propil-1,3-benzodioxol-5-carbaldehído		9.84	77, 135, 192

Si se presta atención a los fotoproductos incluidos en las Tablas IV.4.10 y IV.4.6 se observa que hay una serie de fotoproductos en común (F 5=P 1, F 15=P 2, F 16=P 3, F 18=P 4, F 19=P 11, F 21=P 5, F 22= P 6). Los tiempos de retención han cambiado con respecto al estudio anterior debido a las operaciones habituales de mantenimiento en la columna cromatográfica.

En las Figuras IV.4.31 y IV.4.32 se muestran los **espectros de masas** de aquéllos fotoproductos identificados sobre la base de los correspondientes **espectros de masas teóricos**.

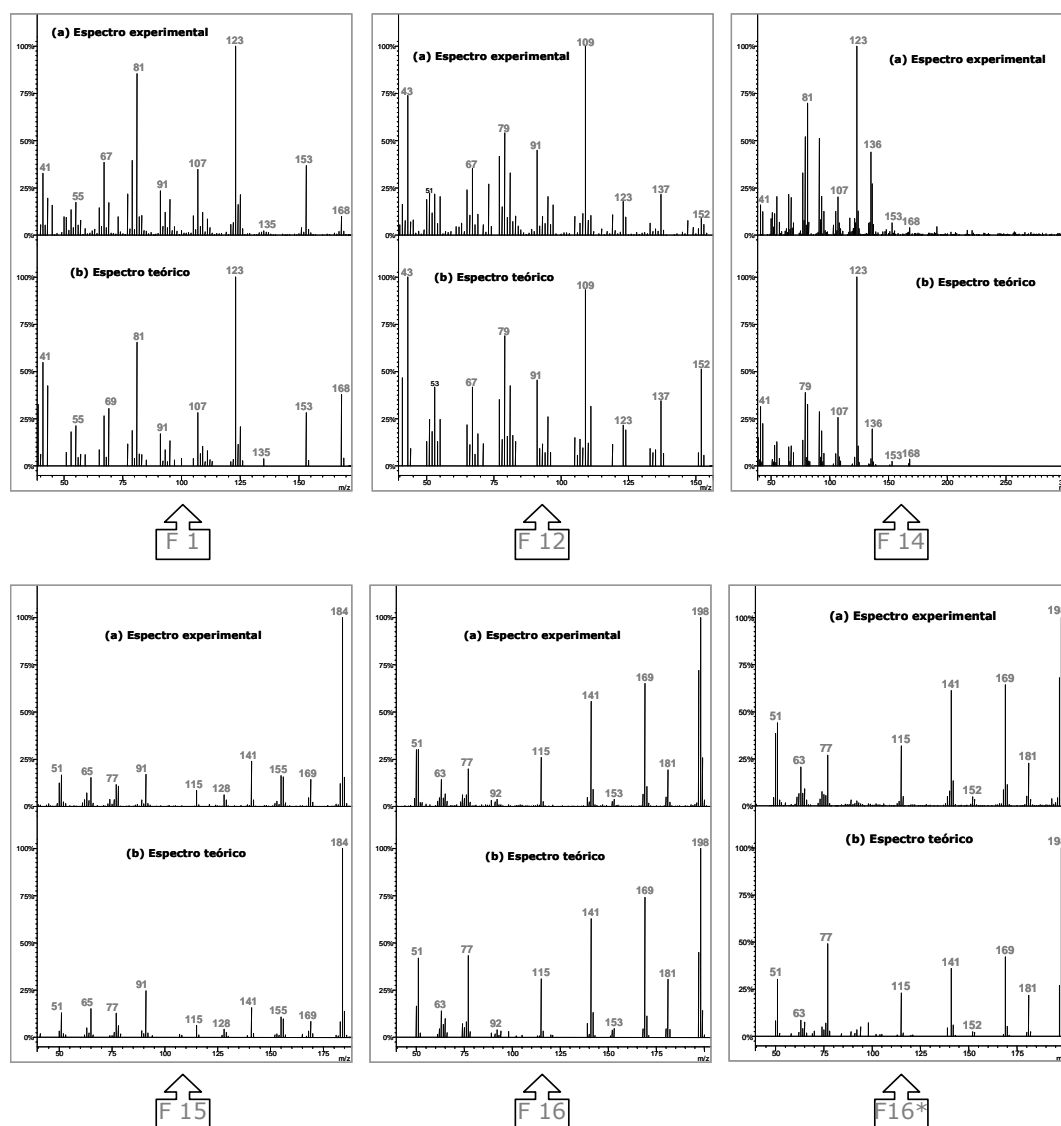


Figura IV.4.31 Espectros de masas experimentales y teóricos de F 1, F 12, F 14, F 15, F 16 y F 16*.

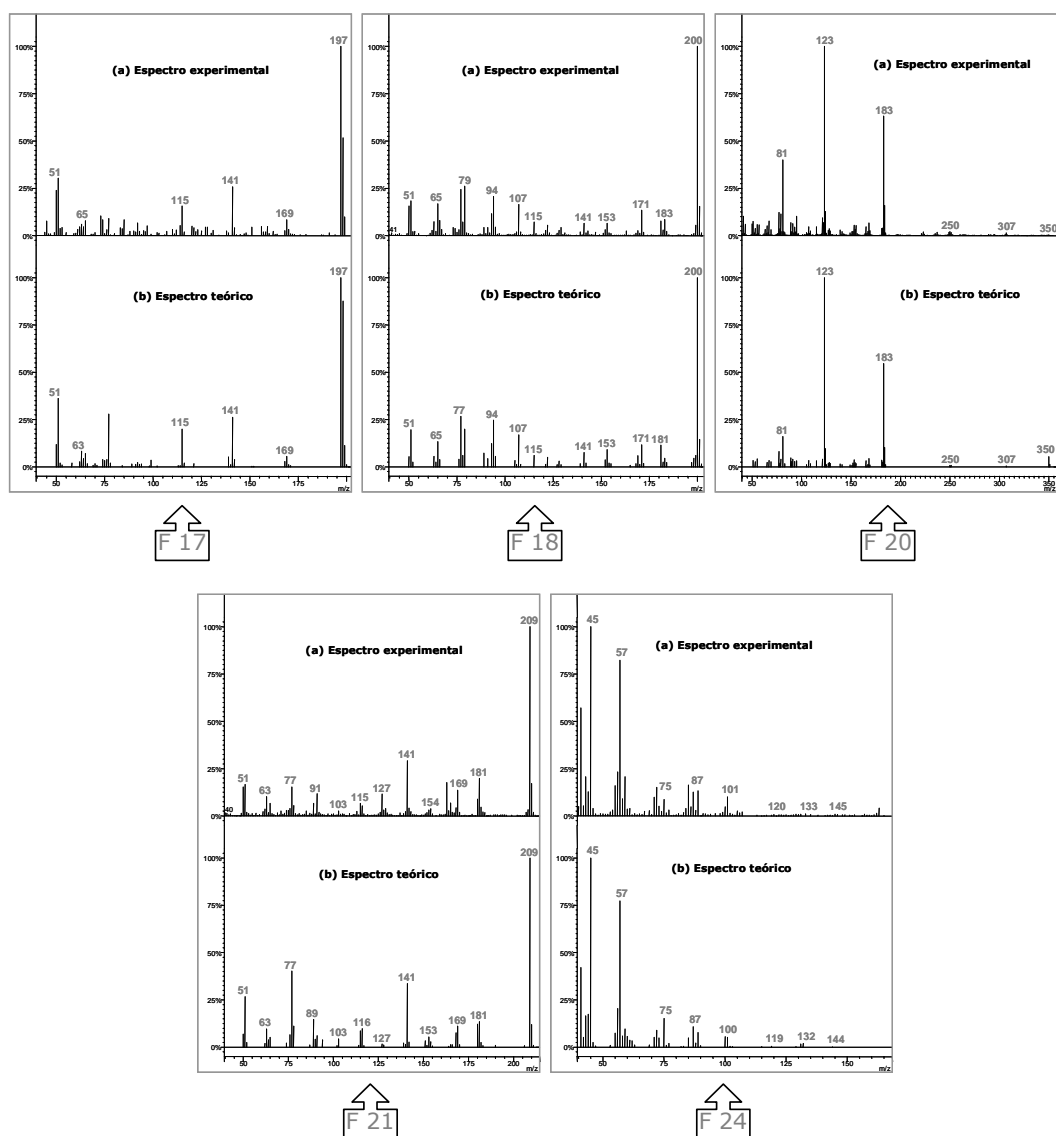


Figura IV.4.32 Espectros de masas experimentales y teóricos de F 17, F 18, F 20, F 21 y F 24.

Por otra parte, en las Figuras IV.4.33 y IV.4.34 se muestran los **espectros de masas** y la **justificación de iones experimentales** de aquéllos fotoproductos para los cuales no se dispuso de los correspondientes espectros de masas teóricos.

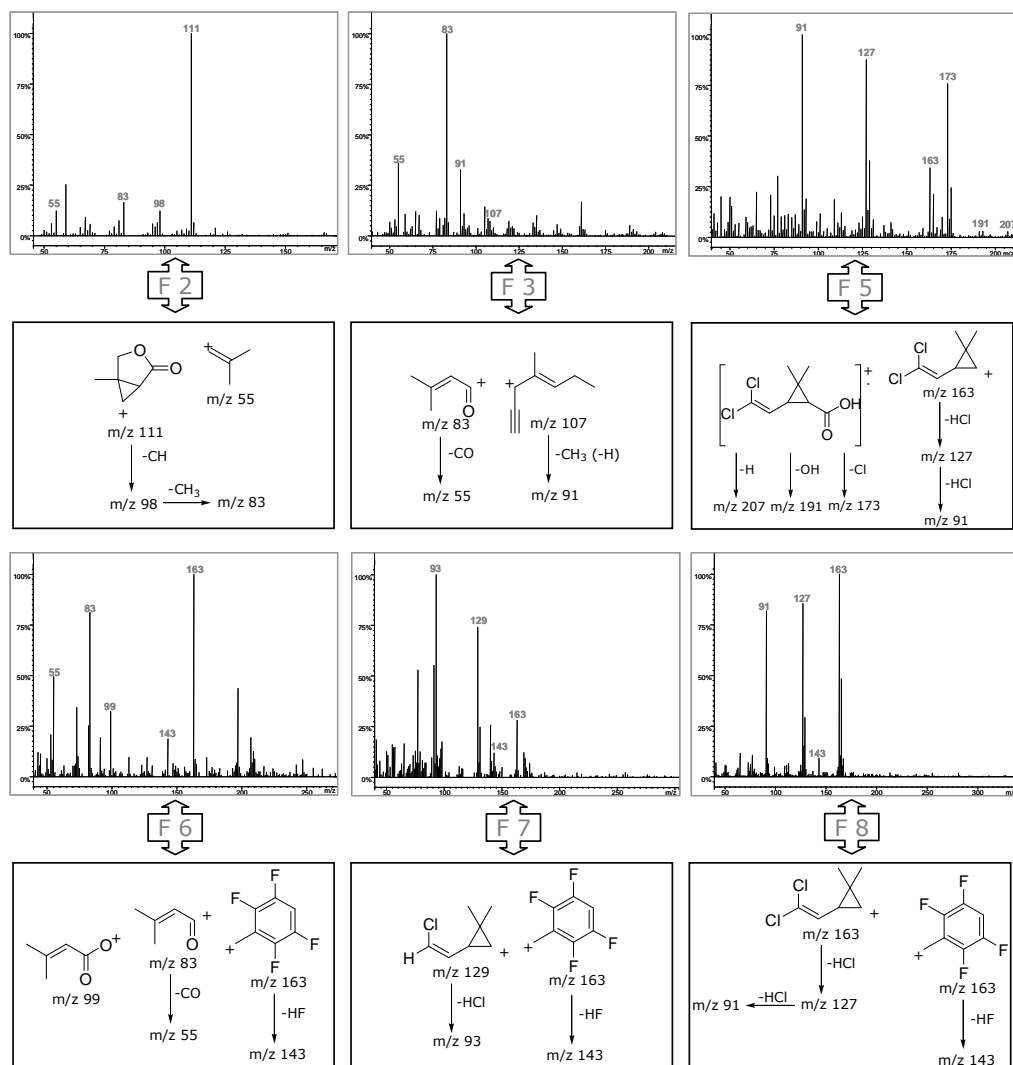


Figura IV.4.33 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de F 2, F 3, F 5, F 6, F 7 y F 8.

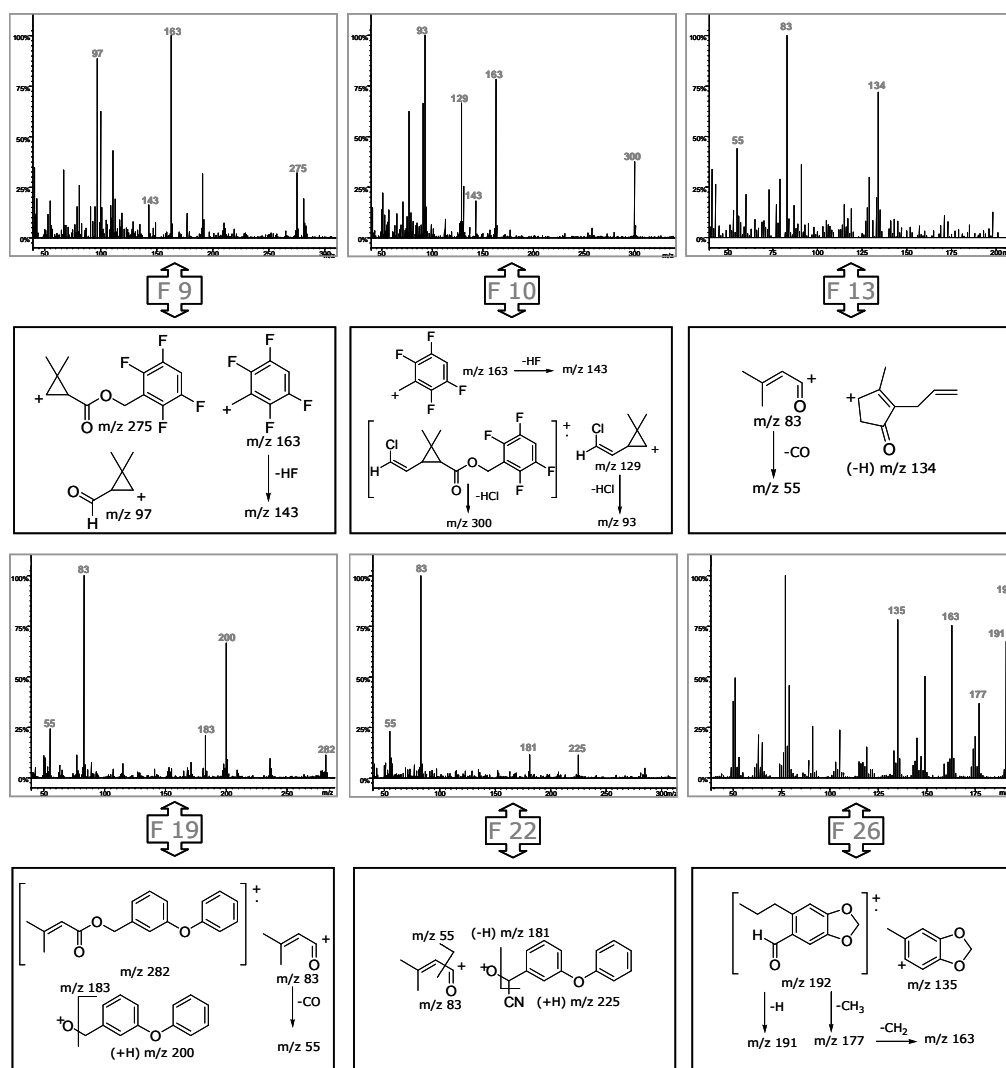


Figura IV.4.34 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de F 9, F 10, F 13, F 19, F 22 y F 26.

Para la identificación de F 13 también se utilizaron datos espectrales consultados en la bibliografía [24]. En lo que respecta al fotoproducto F 25, su estructura se propuso sobre la base de la justificación del patrón de fragmentación observado en el espectro de masas experimental pero también de las similitudes y diferencias entre dicho espectro y el espectro teórico de su isómero 5-isobutil-1,3-benzodioxol (Figura IV.4.35).

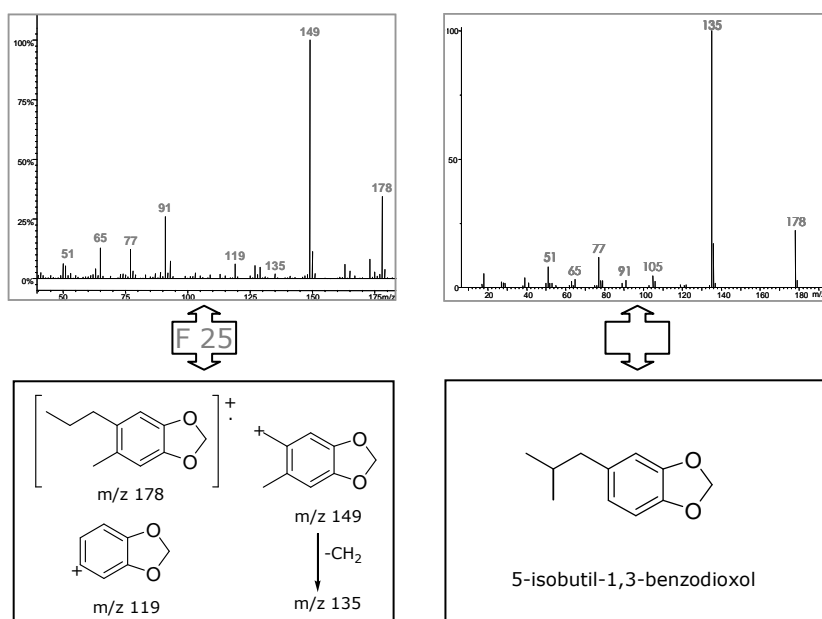


Figura IV.4.35 Espectro de masas y justificación de iones experimentales de F 25, y espectro de masas teórico del 5-isobutil-1,3-benzodioxol.

Finalmente, los fotoproductos F 4, F 11 y F 23 se identificaron tentativamente como **isómeros** de los correspondientes piretroides de partida basándose en las similitudes entre sus espectros de masas experimentales y los de la empentrina, la transflutrina y la cifenotrina, respectivamente (Figura IV.4.36).

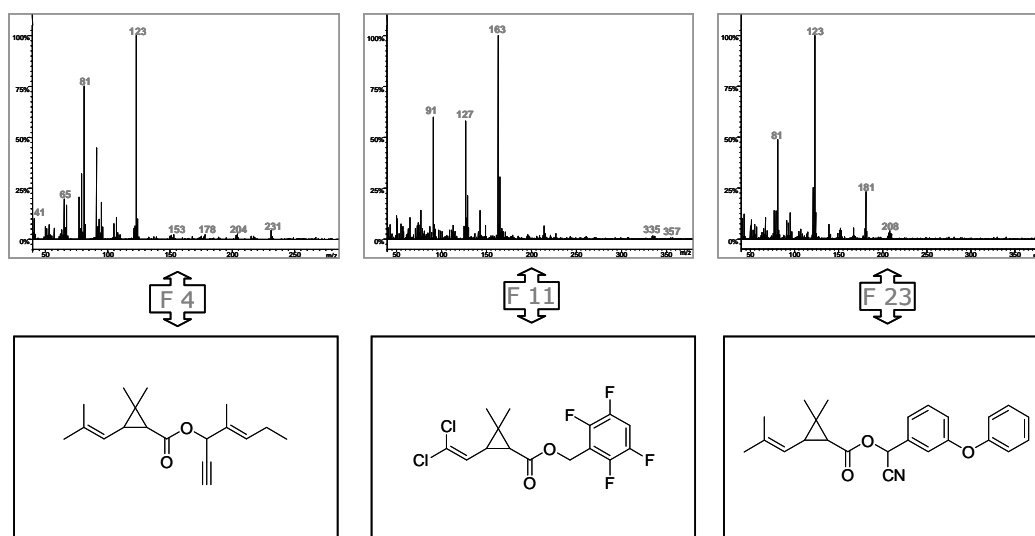


Figura IV.4.36 Espectros de masas experimentales de F 4, F 11 y F 23.

A continuación se discutirán los fotoproductos y rutas de fotodegradación de cada uno de los compuestos investigados.

4.3.3.1 Fotoproductos de la empentrina

Se han propuesto **4** compuestos como fotoproductos de la empentrina: F 1-F 4.

El fotoproducto **F 1** fue identificado tentativamente como el ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propenil)ciclopropanocarboxílico (ácido crisantémico) y lo lógico es que se forme como consecuencia de la **ruptura del enlace éster** de la empentrina. A su vez, la **ciclación** del ácido crisantémico (F 1) puede generar la lactona 5-metil-6-(2-metilprop-1-en-ilo) -3- oxabicyclo [3.1.0] hexan-2-ona (**F 2**).

Por otra parte, el fotoproducto **F 3** se identificó tentativamente como el 3-metilbut-2-enoato de 1-etinil-2-metilpent-2-en-1-ilo. Este **3,3-dimetilacrilato** se puede generar por desproporción del 1,3-radical formado tras la ruptura del enlace 1,3 del anillo ciclopropano.

Finalmente, tal y como se mencionó anteriormente, se detectaron también fotoproductos (**F 4**) con el mismo espectro de masas que la empentrina y, por lo tanto, se propuso la **isomerización** como otra reacción fotoquímica de este piretroide.

Las **rutas de fotodegradación** postuladas para la empentrina se muestran en la Figura IV.4.37. A pesar de que no se ha encontrado información en la bibliografía acerca de la fotodegradación de este piretroide, la ruptura del éster, la formación de 3,3-dimetilacrilatos y la isomerización han sido propuestas por otros autores como rutas de fotodegradación habituales de otros piretroides con enlace éster [22, 24, 25].

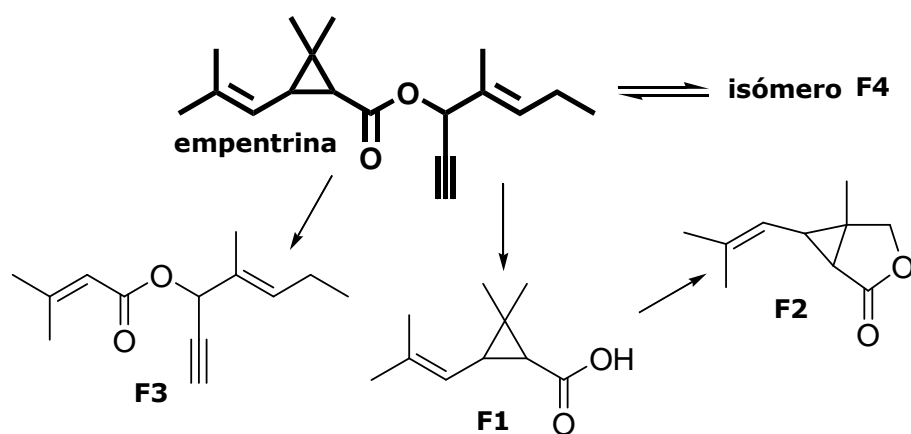


Figura IV.4.37 Rutas de fotodegradación propuestas para la empentrina.

4.3.3.2 Fotoproductos de la transflutrina

Se han propuesto **7** compuestos como fotoproductos de la transflutrina: F 5-F 11.

En primer lugar, el fotoproducto **F 5** se identificó tentativamente como el ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico. Este compuesto puede generarse por **ruptura del enlace éster** de la transflutrina. También se propuso la formación del **dimetilacrilato** 3-metilbut-2-enoato de 2,3,5,6-tetrafluorobencilo (**F 6**).

Por otro lado, la **decarboxilación** de este piretroide puede conducir a la formación del fotoproducto **F 8**, que se identificó tentativamente como 3-{[3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropil] metil}-1,2,4,5-tetrafluorobenceno. En cuanto al fotoproducto **F 10**, identificado tentativamente como 3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2,3,5,6-tetrafluorobencilo, se puede formar por **decloración reductiva** del compuesto de partida. Finalmente, la **decarboxilación** del fotoproducto F 10 y/o la **pérdida de cloro** del fotoproducto F 8 puede generar el fotoproducto **F 7**, que se identificó tentativamente como 3-{[3-(2-clorovinil)-2,2-dimetilciclopropil] metil}-1,2,4,5-tetrafluorobenceno.

En la limitada información disponible acerca de la fotoquímica de la transflutrina, los procesos antes mencionados no se mencionan como rutas de fotodegradación de este piretroide. Sin embargo, la ruptura del enlace éster, la formación de 3,3-dimetilacrilatos, la decarboxilación y la decloración reductiva han sido propuestas por otros autores como rutas de degradación fotoquímica de otros piretroides con enlaces éster y grupos dihalogenovinílicos [2, 9, 15, 18].

También se ha propuesto al 3-formil-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de 2,3,5,6-tetrafluorobencilo (**F 9**) como fotoproducto de la transflutrina. Este compuesto se puede generar como consecuencia de la **ruptura oxidativa** del grupo diclorovinilo de la transflutrina (y/o del fotoproducto F 10). Finalmente, los fotoproductos F 11 tienen el mismo espectro de masas que el piretroide de partida por lo que se identificaron tentativamente como **isómeros** de la transflutrina. Tanto la ruptura oxidativa del grupo diclorovinilo como la isomerización ya habían sido propuestas como rutas de fotodegradación de este piretroide [26].

Sobre la base de los fotoproductos de la transflutrina que han sido identificados tentativamente, se propusieron las rutas de fotodegradación mostradas en la Figura IV.4.38.

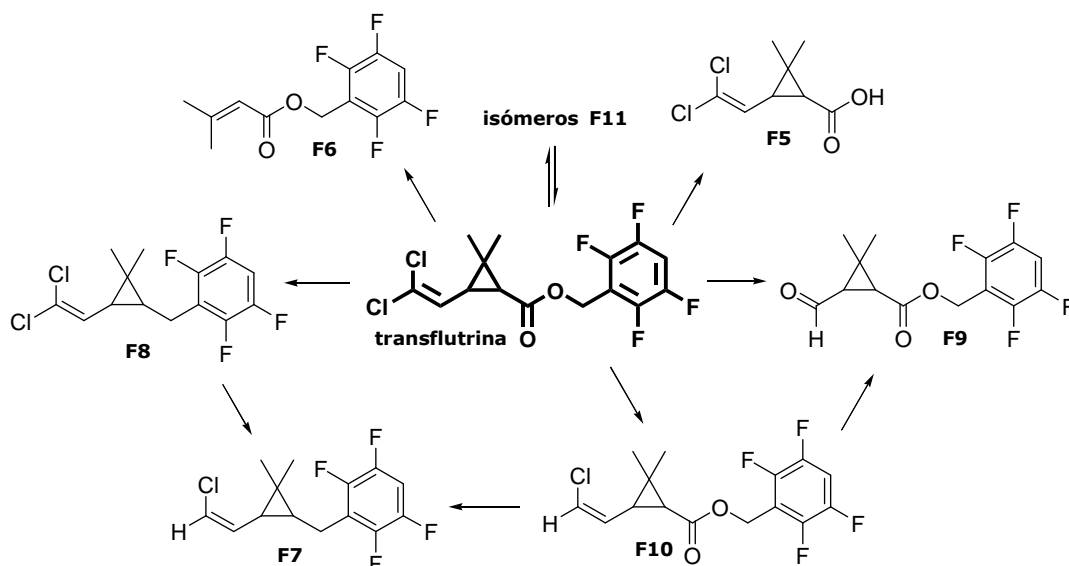


Figura IV.4.38 Rutas de fotodegradación propuestas para la transflutrina.

Registrando las variaciones en las alturas de pico de los fotoproductos F 7 y F 8 de la transflutrina (ver superposición de cromatogramas en la Figura IV.4.39) se obtuvieron las cinéticas de fotoformación-fotodegradación mostradas en la figura.

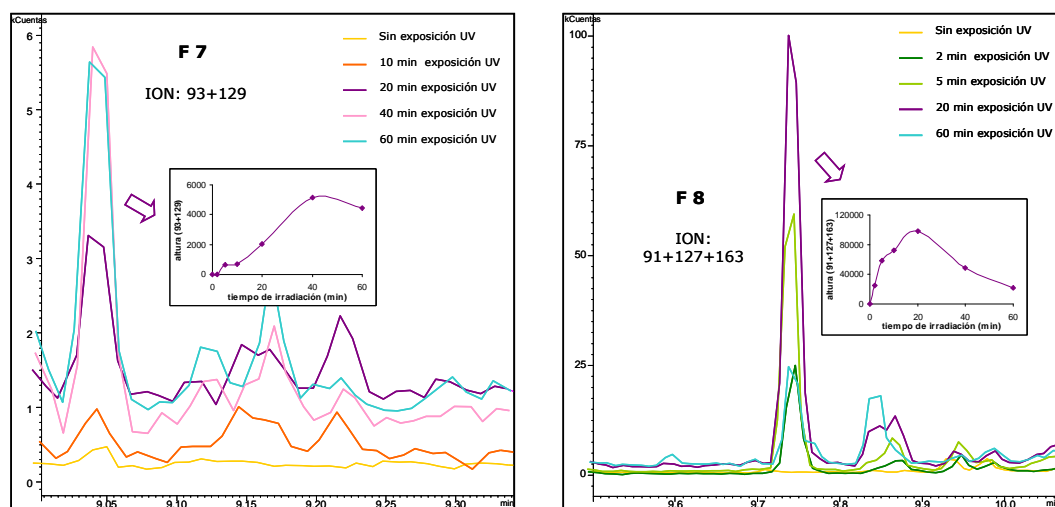


Figura IV.4.39 Superposición de cromatogramas por ion y cinéticas de fotoformación-fotodegradación de los fotoproductos F 7 y F 8.

En la Figura IV.4.39 se observa que el fotoproducto F 8 (transflutrina-CO₂) se empieza a formar ya durante los primeros minutos de irradiación alcanzando su máximo alrededor de los 20 min, tiempo tras el cual la altura de pico comienza a disminuir consecuencia de su fotodegradación. Mientras que el fotoproducto F 7 (transflutrina-Cl-CO₂) tarda unos cinco minutos en empezar a formarse, lo cual se puede atribuir a que este compuesto no se forme directamente a partir de la transflutrina, si no por fotodegradación de otros fotoproductos como F 8 (o F 10).

4.3.3.3 Fotoproductos de la aletrina

La **ruptura del enlace éster** se propuso como ruta de fotodegradación de la aletrina debido a la identificación tentativa del ácido crisantémico (**F 1**) y de la 4-hidroxi-3-metil-2-(2-propenil)-2-ciclopenten-1-ona (**F 12**) como fotoproductos; aunque F 12 también se podría generar a partir del fotoproducto F 13. Tanto F 1 como F 12 ya habían sido identificados por otros autores como fotoproductos de este piretroide [22, 27]. El 5-metil-6-(2-metilprop-1-en-1-ilo)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-ona (F 2), que probablemente se obtenga de la **ciclación** de F 1, también se postuló como fotoproducto de la aletrina.

F 13, el 3-metilbut-2-enoato de 3-alil-2-metil-4-oxociclopent-2-en-1-ilo, se identificó tentativamente como fotoproducto de la aletrina, tal y como ya habían hecho anteriormente Isobe y col. [24].

La **isomerización** también se sugirió como ruta de fotodegradación de este piretroide puesto que el fotoproducto **F 14** tiene el mismo espectro de masas que el compuesto de partida. La fotoisomerización de la aletrina ya había sido propuesta por Ruzo y col. [25].

Las rutas de fotodegradación sugeridas para la aletrina se muestran en la Figura IV.4.40.

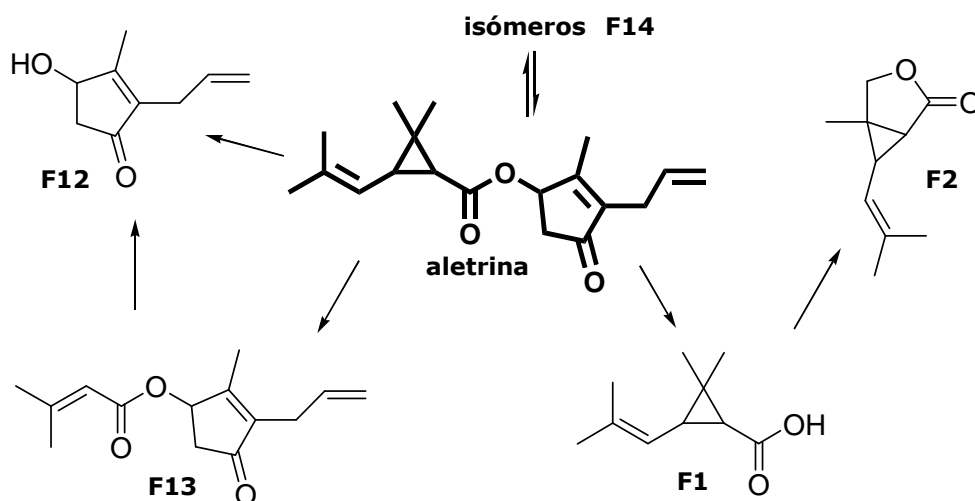


Figura IV.4.40 Rutas de fotodegradación propuestas para la aletrina.

4.3.3.4 Fotoproductos de la fenotrina

Se sugirió la **ruptura del enlace éster** como ruta de fotodegradación de la fenotrina debido a la identificación tentativa del ácido crisantémico (**F 1**) y del (3-fenoxifenil)metanol (**F 18**) como fotoproductos de este piretroide. El fotoproducto **F 18** también se puede formar a partir del fotoproducto **F 19**. Además, la lactona **F 2** también se propuso como fotoproducto.

Los fotoproductos **F 15** y **F 16** se identificaron tentativamente como 1-metil-3-fenoxibenceno y 3-fenoxibenzaldehído, respectivamente. El fotoproducto **F 15** puede generarse por pérdida del grupo hidroxilo del fotoproducto **F 18** o por ruptura del enlace C_{α} -O de la fenotrina y/o del fotoproducto **F 19**. Además, la fotoisomerización de **F 16** (el cual se forma probablemente por **fotooxidación** del (3-fenoxifenil)metanol)) puede conducir a la generación de **F 17**, que se ha identificado tentativamente como 4-fenoxibenzaldehído.

El **dimetilacrilato** 3-metilbut-2-enoato de 3-fenoxibencilo (**F 19**) también se propuso como fotoproducto de la fenotrina y finalmente, tal y como se mencionó antes, se postuló la **isomerización** (**F 20**) como ruta de fotodegradación de este piretroide.

Las **rutas de fotodegradación** propuestas para la fenotrina se muestran en la Figura IV.4.41. La formación de F 1, F 16, F 18 y F 20 como fotoproductos de este insecticida ya había sido descrita por Ruza y col. [22]. Por otra parte, aunque el fotoproducto F 19 no ha sido encontrado como fotoproducto de la fenotrina por otros autores, en otros estudios se ha observado que la formación de 3,3-dimetilacrilatos es una ruta de fotodegradación habitual en piretroides de estructura similar [2, 24].

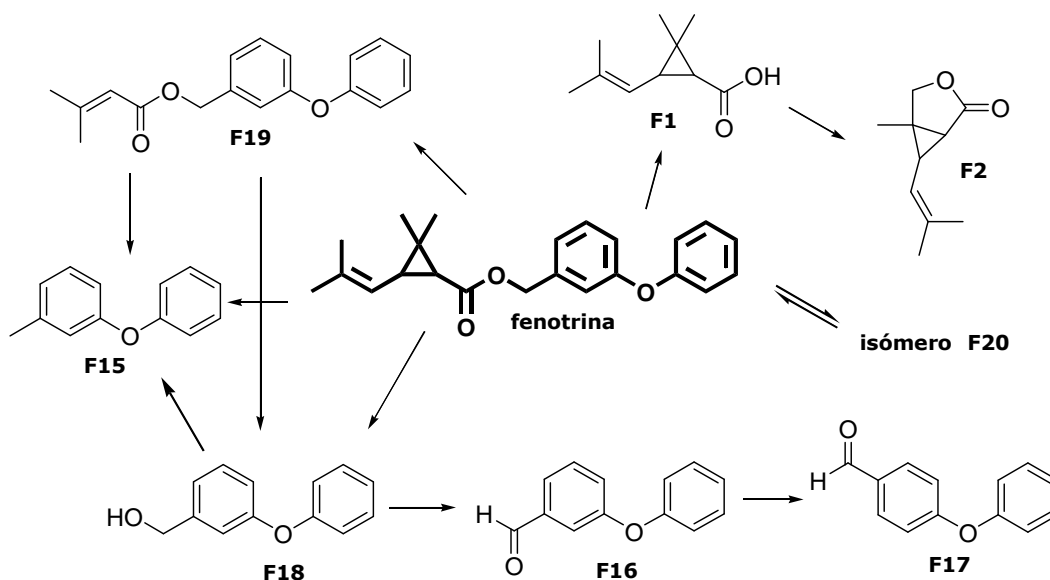


Figura IV.4.41 Rutas de fotodegradación propuestas para la fenotrina.

En la Figura IV.4.42 se muestra la superposición de los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de irradiación UV, así como la correspondiente cinética de F 19.

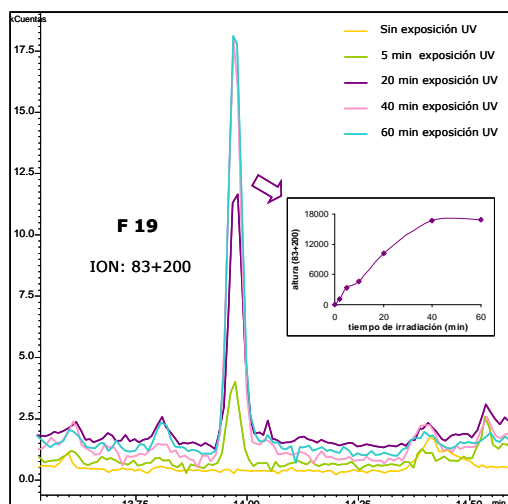


Figura IV.4.42 Cromatogramas por ion obtenidos a diferentes tiempos de irradiación UV y cinética de fotoformación-fotodegradación de F 19.

4.3.3.5 Fotoproductos de la cifenotrina

Los compuestos **F 1**, **F 2**, **F 16** y **F 18** también se detectaron como fotoproductos de la cifenotrina. De nuevo, la formación del ácido crisantémico (**F 1**) sugiere que la **ruptura del enlace éster** es una de las rutas de fotodegradación de este piretroide.

En este caso, sin embargo, la identidad del fotoproducto **F 16** no se pudo confirmar debido al gran parecido entre los espectros de masas teóricos del 3-fenoxibenzaldehído y otro posible fotoproducto de la cifenotrina como es el hidroxí(3-fenoxifenil)acetonitrilo, que se puede formar por **ruptura del enlace éster** del piretroide de partida (y/o del fotoproducto **F 22**). Por lo tanto, este fotoproducto podría tratarse del 3-fenoxibenzaldehído (**F 16**) o del hidroxí(3-fenoxifenil)acetonitrilo (**F 16***), o de ambos. El 3-fenoxibenzaldehído probablemente se generaría por **fotooxidación** del (3-fenoxifenil)metanol (**F 18**) el cual, a su vez, se podría formar por ruptura del enlace éster y pérdida del grupo ciano de la cifenotrina (y/o del fotoproducto **F 22**).

El fotoproducto **F 21**, identificado tentativamente como (3-fenoxifenil)acetonitrilo, puede generarse por pérdida del grupo hidroxilo del hidroxí(3-fenoxifenil)acetonitrilo o por ruptura del enlace $C_{\alpha}-O$ de la cifenotrina y/o del fotoproducto **F 22**.

La **formación de 3,3-dimetilacrilatos** también se propuso como ruta de fotodegradación de la cifenotrina debido a la identificación tentativa del 3-metilbut-2-enoato de ciano(3-fenoxifenil)metilo (**F 22**) como fotoproducto (ver los correspondientes cromatogramas y cinética en la Figura IV.4.43).

Finalmente, la **fotoisomerización** se postuló como reacción de fotodegradación debido a la localización de un fotoproducto (**F 23**) con el mismo espectro de masas que la cifenotrina.

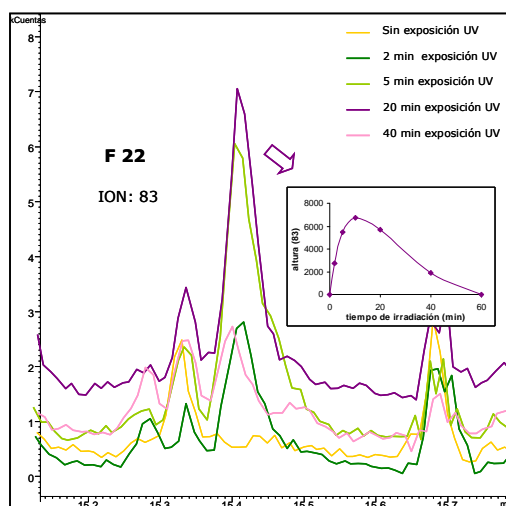


Figura IV.4.43 Cromatogramas por ion obtenidos a diferentes tiempos de irradiación y cinética de fotoformación-fotodegradación de F 22.

Sobre la base de los fotoproductos de la cifenotrina que fueron identificados tentativamente, se propusieron las **rutas de fotodegradación** mostradas en la Figura IV.4.44.

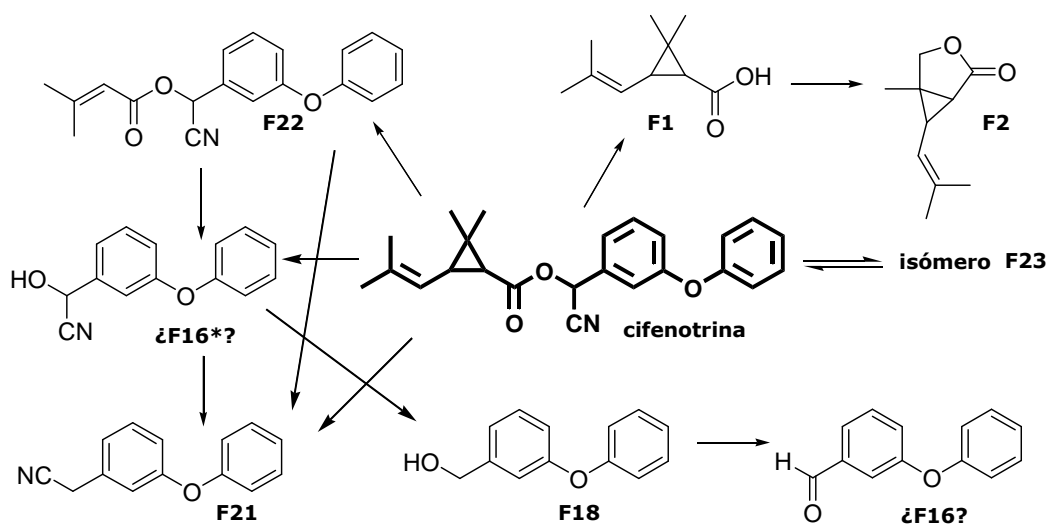


Figura IV.4.44 Rutas de fotodegradación propuestas para la cifenotrina.

4.3.3.6 Fotoproductos del PBO

Se identificaron **tres** compuestos como fotoproductos del butóxido de piperonilo: F 24-F 26.

Por una parte se propusieron como fotoproductos el 2-(2-butoxi-etoxi)-etanol (**F 24**) y el 5-metil-6-propil-1,3-benzodioxol (**F 25**). Ambos compuestos, previamente detectados por otros autores [28], pueden generarse a partir del PBO por **ruptura del enlace C-O en posición bencílica**.

El fotoproducto **F 26** del PBO se identificó tentativamente como 6-propil-1,3-benzodioxol-5-carbaldehído. Este compuesto, que puede obtenerse por pérdida de la cadena lateral butoxietoxietilo del PBO y por la subsiguiente oxidación al correspondiente aldehído del alcohol bencílico resultante, ya había sido identificado anteriormente como fotoproducto del PBO [29-31].

Las **rutras de fotodegradación** propuestas para el butóxido de piperonilo se ilustran en la Figura IV.4.45.

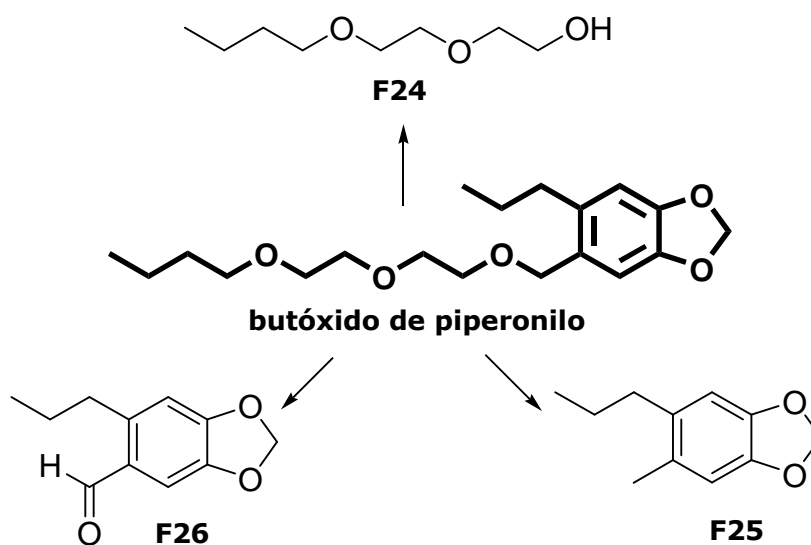


Figura IV.4.45 Rutras de fotodegradación propuestas para el PBO.

La superposición de los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de irradiación, así como la correspondiente cinética del fotoproducto F 26 se muestran en la Figura IV.4.46.

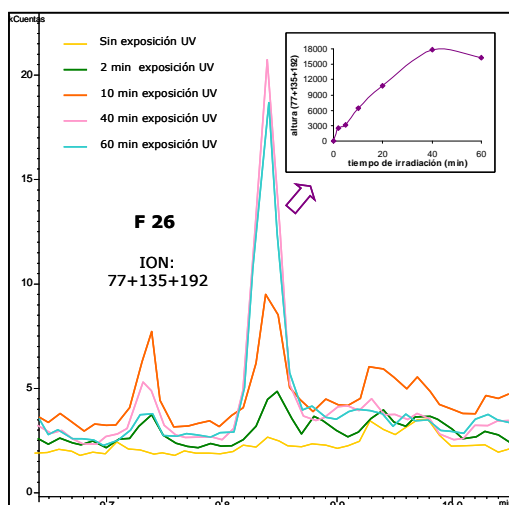


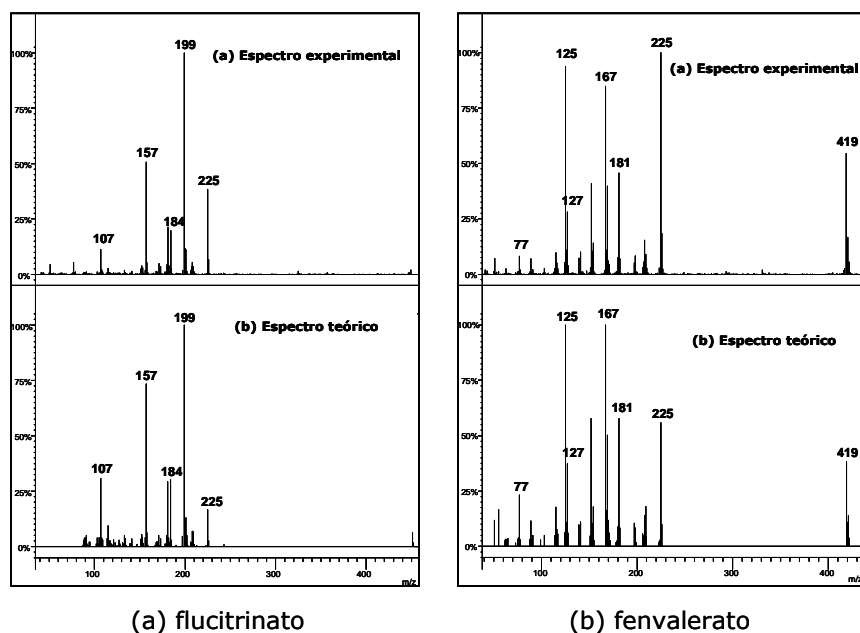
Figura IV.4.46 Cromatogramas por ion obtenidos a diferentes tiempos de irradiación y cinética de fotoformación-fotodegradación de F 26.

4.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS: PIRETROIDES CARENTES DE ANILLO CICLOPROPANO

En este último estudio se ha investigado la fotodegradación de dos piretroides carentes del anillo ciclopropano: **flucitrinato y fenvalerato**. De nuevo, ambos productos fueron adquiridos como **mezclas isoméricas** de tal manera que, bajo las condiciones de análisis especificadas en la Tabla IV.4.2, se obtuvieron dos picos cromatográficos para cada uno de los compuestos. Cada uno de esos picos se cuantificó por separado y los correspondientes tiempos de retención e iones de cuantificación se han incluido en la Tabla IV.4.11. En la Figura IV.4.47 se muestran los **espectros de masas experimentales y teóricos** de ambos piretroides.

Tabla IV.4.11 Tiempos de retención e iones de cuantificación de los piretroides estudiados.

Compuesto	t _r (min)	Iones de cuantificación
Flucitrinato (1)	26,69	157+199
Flucitrinato (2)	26,89	157+199
Fenvalerato (1)	27,43	125+167
Fenvalerato (2)	27,66	125+67

**Figura IV.4.47** Espectros de masas teóricos y experimentales de: (a) flucitrinato; (b) fenvalerato.

4.4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

4.4.1.1 Espectros UV

Los **espectros de absorción UV** del flucitrinato y del fenvalerato en agua ultrapura (10 ng mL^{-1}) se muestran en la Figura IV.4.48. Los patrones espectrales observados para ambos compuestos son muy similares, lo cual es bastante lógico si se tiene en cuenta que las diferencias estructurales entre ellos son mínimas y poco importantes desde el punto de vista de la absorción en la región UV.

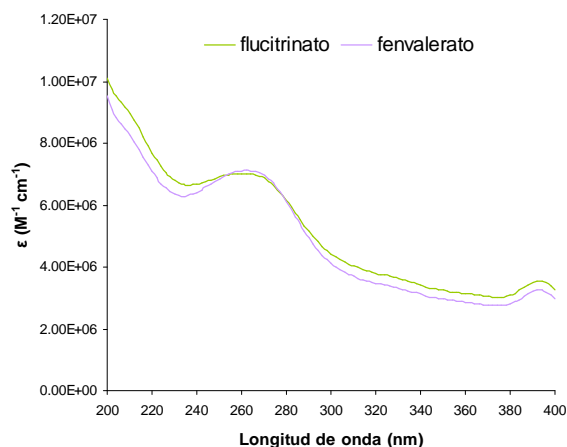


Figura IV.4.48 Espectros de absorción UV del fenvalerato y del flucitrinato.

A partir de los datos espectrales obtenidos se estimaron los **coeficientes de absorción molar** a los máximos de emisión de las dos lámparas empleadas en este estudio: **254 nm y 366 nm** (Tabla IV.4.12).

Tabla IV.4.12 Coeficientes de absorción molar a 254 nm y 366 nm.

	$\epsilon_{254} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	$\epsilon_{366} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$
Flucitrinato	$6,98 \cdot 10^6$	$3,07 \cdot 10^6$
Fenvalerato	$7,00 \cdot 10^6$	$2,80 \cdot 10^6$

Tal y como se esperaba, ambos insecticidas absorben prácticamente el mismo número de fotones a las longitudes de onda consideradas. A la vista de estos resultados, y si la cantidad de fotones absorbidos fuese el único factor determinante de la velocidad de fotodegradación de estos compuestos, sería de esperar que flucitrinato y fenvalerato se fotodegradasen a velocidades similares. Además, ambos piretroides absorben menos radiación a 366 nm que a 254 nm, por lo que es de suponer que las transformaciones fotolíticas sean más lentas a 366 nm.

4.4.1.2 Influencia de la fuente de irradiación

Los primeros pasos en el estudio de la fotodegradación en fibra del flucitrinato y fenvalerato tuvieron como objetivo estudiar la influencia de la **fuentes de irradiación**

empleada y, de esta manera, elegir las condiciones de irradiación más adecuadas para las siguientes experiencias.

En primer lugar se realizaron una serie de experimentos en los que la fibra (con los piretroides ya absorbidos) se expuso durante **120 min** a dos lámparas diferentes: una **lámpara negra fluorescente** (8 W, 366 nm) y una **lámpara de mercurio de baja presión** (8 W, 254 nm). Transcurrido ese tiempo, se observó que con la lámpara negra se había degradado alrededor de un 40% de los analitos, mientras que con la lámpara de mercurio de baja presión la degradación fue prácticamente del 100%. Por lo tanto, la fotodegradación de los piretroides fue evidente en ambos casos y más lenta a 366 nm que a 254 nm, para una misma potencia nominal, tal y como se había predicho a partir de los datos de la Tabla IV.4.12.

A continuación se estudió **la influencia de la potencia** a 254 nm. Para ello, se realizaron pruebas a 18 W y se compararon los resultados con los obtenidos a 8 W. Lógicamente, la fotodegradación de los insecticidas investigados fue más rápida al trabajar a 18 W.

Si los experimentos de fotodegradación se realizaran a 366 nm, se tendrían que estudiar tiempos de irradiación demasiado largos. Por otro lado, al trabajar a 254 nm con una potencia de 18 W, la degradación de fenvalerato y flucitrinato es tan rápida que sería complicado definir su comportamiento cinético y detectar algunos fotoproductos. De manera que, por razones prácticas, en los experimentos posteriores se decidió estudiar la foto-SPME de estos compuestos utilizando la **lámpara de mercurio de baja presión (254 nm)** de **8 W**.

4.4.1.3 Test de oscuridad

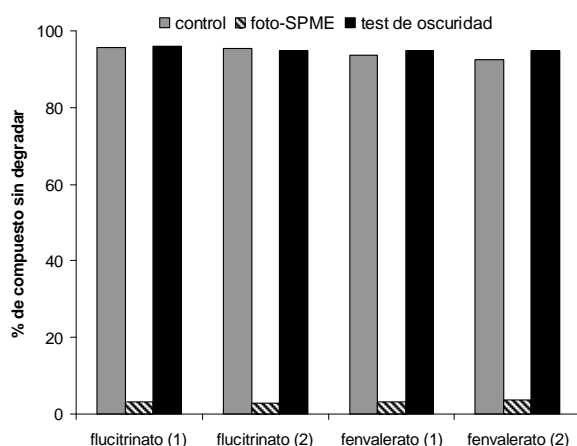


Figura IV.4.49 Resultados del test de oscuridad y de la foto-SPME (60 min) para los piretroides estudiados comparados con los obtenidos en el experimento control.

Como ya se hizo para los otros compuestos investigados, se realizó un **test de oscuridad** con el objetivo de cerciorarse de que el descenso en la respuesta analítica del flucitrinato y del fenvalerato en las pruebas en las que la fibra de SPME es irradiada con luz UV se debe únicamente a **la acción de los fotones**. Para ello, se realizaron los mismos experimentos (control, foto-SPME y test de oscuridad) que los indicados en el **Apartado 4.2.1.2**, con la

diferencia de que en este caso se extrajeron alícuotas de 8 mL (ver **Apartado 4.1.1**) de 1 ng/mL de los compuestos estudiados. Además, la fibra (retraída o no) se expuso durante **60 min** a la luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) trabajando a una potencia de 8 W.

En la Figura IV.4.49 se muestran los resultados obtenidos en estas pruebas. Tras 60 min de irradiación se observó un claro descenso en las áreas de pico, mientras que no se apreció una reducción de las respuestas en el test de oscuridad. Por lo tanto, con estos resultados se demostró que durante la irradiación de la fibra no se producen pérdidas de los analitos por otros procesos como la volatilización.

4.4.2 FOTO-SPME

4.4.2.1 Influencia del tiempo de irradiación

Se trazaron las **cinéticas de fotodegradación** de los piretroides investigados estudiando la influencia del tiempo de irradiación ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 8 W) en la respuesta analítica de los mismos.

Para ello se tomaron alícuotas de 8 mL de una disolución de 1 ng/mL de los piretroides estudiados en agua Milli-Q. Tras la etapa de extracción, la fibra se expuso a la luz UV durante diferentes períodos de tiempo comprendidos entre 0 y 60 min. A continuación, la fibra se introdujo en el inyector del cromatógrafo de gases y se registraron las variaciones en las áreas de pico de los analitos. En la Figura IV.4.50 se superponen los **cromatogramas** correspondientes a 0, 5, 15 y 60 min de irradiación UV. En la figura se observa un claro descenso en las áreas de pico del flucitrinato y del fenvalerato a medida que se incrementa el tiempo de exposición a la radiación.

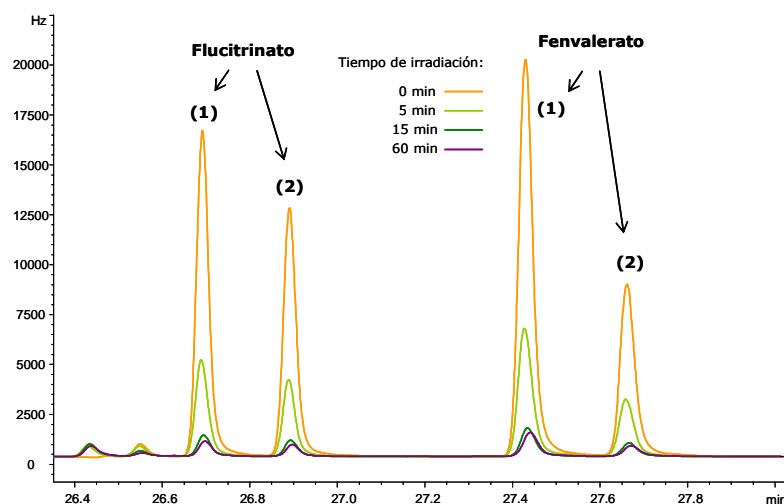


Figura IV.4.50 Superposición de los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de irradiación para el flucitrinato y fenvalerato.

Las **cinéticas de fotodegradación** obtenidas se muestran en la Figura IV.4.51. En todos los casos se aprecian pérdidas de más del 90% tras 15 min de irradiación UV.

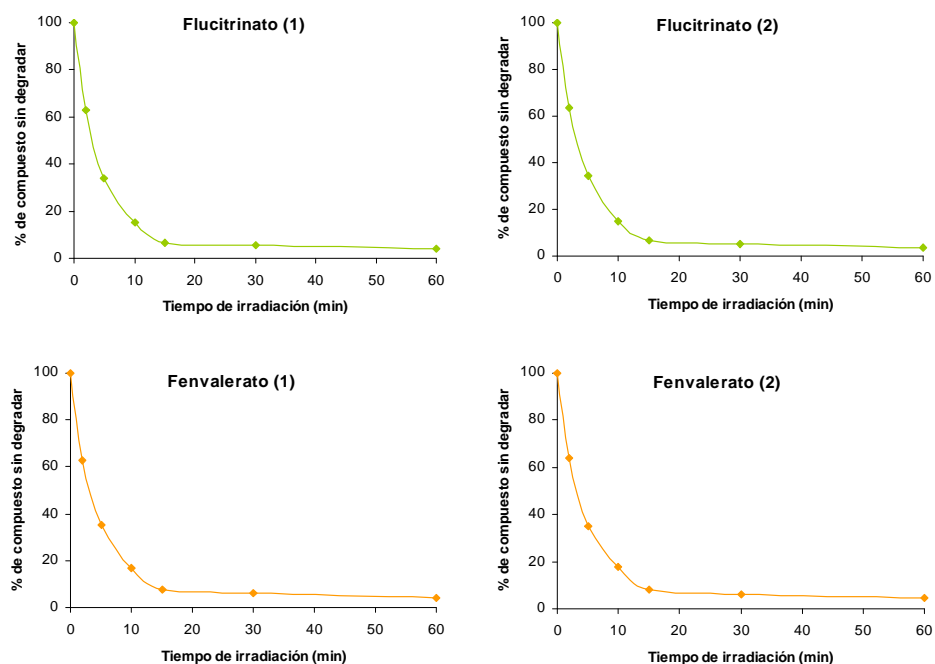


Figura IV.4.51 Cinéticas de la fotodegradación en fibra de los piretroides estudiados.

4.4.2.2 Comportamiento cinético de primer orden

Se representó el logaritmo neperiano del porcentaje de compuesto sin degradar frente al tiempo de irradiación y los resultados obtenidos (ver Figura IV.4.52) demostraron que, bajo las condiciones estudiadas en este trabajo, la fotodegradación del fenvalerato y del flucitrinato presenta un **comportamiento cinético de primer orden**.

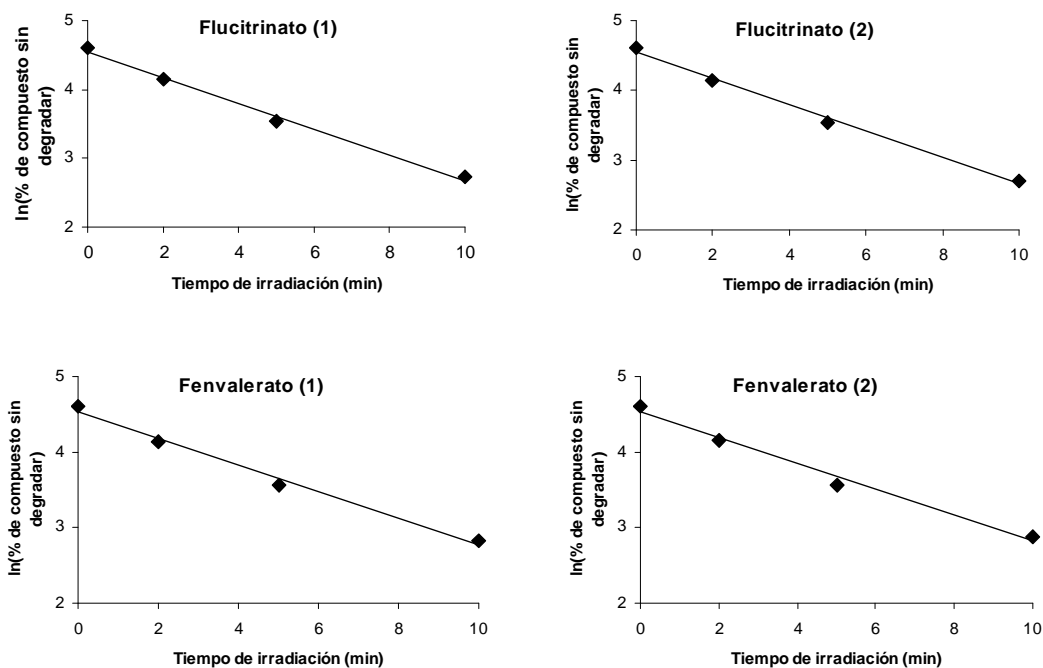


Figura IV.4.52 Demostración del comportamiento cinético de primer orden para la fotodegradación en fibra de los piretroides estudiados.

Los **rangos de tiempo** considerados en las regresiones lineales mostradas en la Figura IV.4.52 terminan en 10 min puesto que, a partir de este punto, las curvas cinéticas correspondientes comienzan a tender asintóticamente hacia cero.

Otros autores también observaron un **orden de reacción de uno** para la fotodegradación del esfenvalerato (*S,S*-fenvalerato) en disoluciones acuosas tamponadas [32] y del flucitrinato en agua y sobre superficies de suelo, vidrio y hoja [33, 34].

A partir de las pendientes de las rectas obtenidas del ajuste por mínimos cuadrados, se calcularon las **constantes de velocidad y los tiempos de vida media**. Ambos datos junto con los **coeficientes de correlación (R)** correspondientes a los ajustes lineales mostrados en la Figura IV.4.52 se han incluido en la Tabla IV.4.13.

Tabla IV.4.13 Parámetros cinéticos del fenvalerato y del flucitrinato.

	R	k_{ap} (min⁻¹)	t_{1/2} (min)
Flucitrinato (1)	0,9969	0,187	3,71
Flucitrinato (2)	0,9974	0,188	3,68
Fenvalerato (1)	0,9948	0,176	3,95
Fenvalerato (2)	0,9929	0,170	4,07

El gran parecido entre los parámetros cinéticos de uno y otro piretroide es consistente con los datos espectrales (Tabla IV.4.12).

4.4.3 IDENTIFICACIÓN DE FOTOPRODUCTOS

La exposición de flucitrinato y fenvalerato a la luz UV (8 W, 254 nm) condujo a la formación de un gran número de **fotoproductos**. De nuevo, algunos de estos compuestos fueron identificados tentativamente sobre la base de sus **espectros de masas**, de la **información publicada por otros autores** y de la **librería de espectros de masas** de la NIST.

Los fotoproductos propuestos en este estudio se han incluido en las Tablas IV.4.14-IV.4.16. Debido al gran parecido estructural entre los piretroides objeto de estudio, estos presentan una serie de fotoproductos (denotados con el prefijo FP en la Tabla IV.4.14) y rutas de fotodegradación comunes. Los fotoproductos específicos del flucitrinato se han enumerado con el prefijo FLU (Tabla IV.4.15), y los del fenvalerato con el prefijo FEN (Tabla IV.4.16). Además, algunos de estos fotoproductos (FLU 1, FLU 3-5, FLU 7-8, FP 4 para el flucitrinato, FEN 4-5, FEN 8) se han encontrado por vez primera en este trabajo.

Tabla IV.4.14 Fotoproductos comunes generados en la foto-SPME de flucitrinato y fenvalerato.

Código	Fotoproducto	Estructura	tr (min)	Iones de cuantificación
FP 1	3-fenoxibenzaldehído		10,74	198
FP 1*	hidroxi(3-fenoxifenil)acetonitrilo		10,74	198
FP 2	2-oxo-2-(3-fenoxifenil)acetonitrilo		11,60	223, 168
FP 3	2,3-bis(3-fenoxifenil)succinonitrilo		14,33	209,181
FP 4	4-metil-2-(3-fenoxifenil)-3-fenilpentanonitrilo		24,38-24,75	91

Tabla IV.4.15 Fotoproductos generados en la foto-SPME del flucitrinato.

Código	Fotoproducto	Estructura	tr (min)	Iones de cuantificación
FLU 1	4-(difluorometoxi)benzaldehído		5,49	171, 172
FLU 2	1-(difluorometoxi)-4-isobutilbenceno		5,93	157, 200
FLU 3	1-(difluorometoxi)-4-(2-metilprop-1-enil)benceno		6,64	198
FLU 4	1,2-bis(4-(difluorometoxi)fenil)etano-1,2-diona		7,68	171
FLU 5	1,2-bis(4-(difluorometoxi)fenil)etano-1,2-diol		7,92	173

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

Tabla IV.4.15 Fotoproductos generados en la foto-SPME del flucitrinato, (continuación).

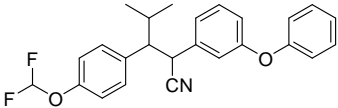
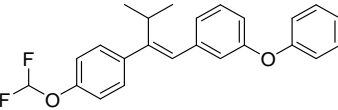
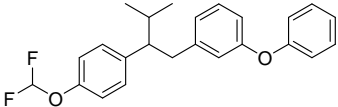
Código	Fotoproducto	Estructura	tr (min)	Iones de cuantificación
FLU 6	3-(4-(difluorometoxi)fenil)-4-metil-2-(3-fenoxifenil)pentanonitrilo		25,08-25,41	157, 199
FLU 7	1-(2-(4-(difluorometoxi)fenil)-3-metilbut-1-enil)-3-fenoxibenceno		27,07	172, 380
FLU 8	1-(2-(4-(difluorometoxi)fenil)-3-metilbutil)-3-fenoxibenceno		27,20	172, 382

Tabla IV.4.16 Fotoproductos generados en la foto-SPME del fenvalerato.

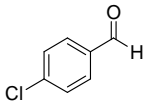
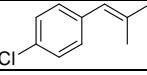
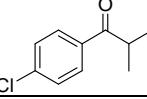
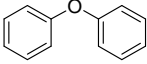
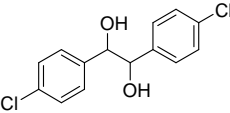
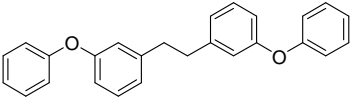
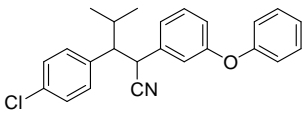
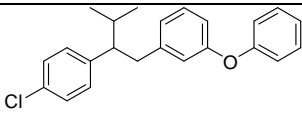
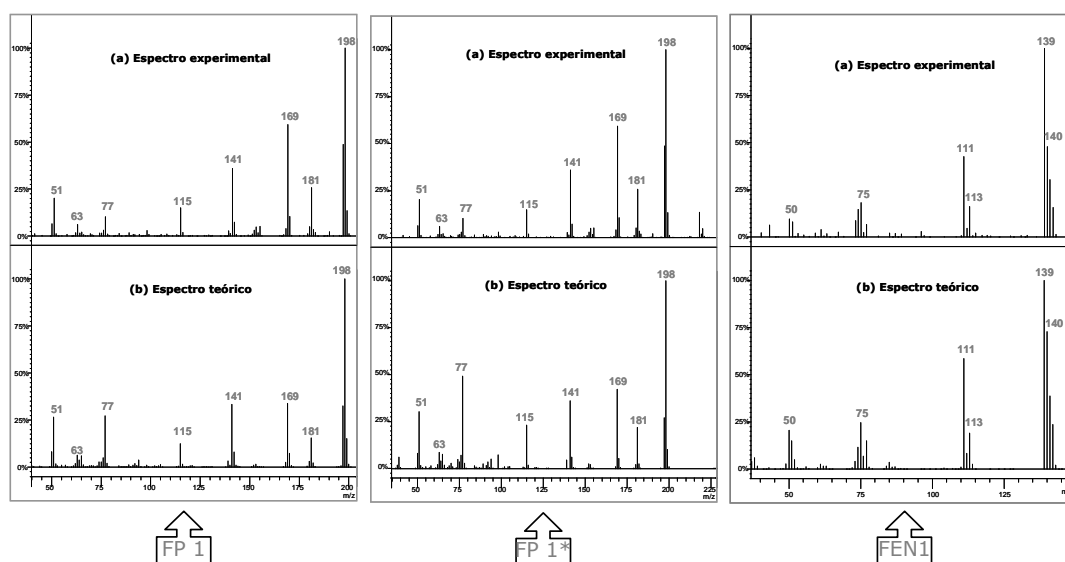
Código	Fotoproducto	Estructura	tr (min)	Iones de cuantificación
FEN 1	4-clorobenzaldehído		5,49	139, 140
FEN 2	1-cloro-4-(2-metilprop-1-enil)benceno		6,95	131, 166
FEN 3	1-(4-clorofenil)-2-metilpropan-1-ona		7,87	139
FEN 4	1-fenoxibenceno		8,20	170
FEN 5	1,2-bis(4-clorofenil)etano-1,2-diol		8,27	141, 143
FEN 6	1,2-bis(3-fenoxifenil)etano		10,50	183

Tabla IV.4.16 Fotoproductos generados en la foto-SPME del fenvalerato, (continuación).

Código	Fotoproducto	Estructura	tr (min)	Iones de cuantificación
FEN 7	3-(4-clorofenil)-4-metil-2-(3-fenoxifenil)pentanonitrilo		25,79- 26,10	125, 167
FEN 8	1-(2-(4-clorofenil)-3-metilbutil)-3-fenoxibenceno		28,16	140

En las Figuras IV.4.53 y IV.4.54 se muestran los espectros de masas de aquéllos fotoproductos identificados sobre la base de su correspondiente **espectro de masas teórico**.

**Figura IV.4.53** Espectros de masas experimentales y teóricos de FP 1, FP 1* y FEN 1.

El espectro de masas experimental del fotoproducto con tiempo de retención 10,74 min es muy similar a los espectros teóricos del 3-fenoxibenzaldehído (FP 1) y del hidroxí(3-fenoxifenil)acetónitrilo (FP 1*) (ver Figura IV.4.53). Se trata del mismo fotoproducto nombrado como P 3 y F 16 en los estudios anteriores. En este caso,

ambos compuestos son posibles fotoproductos del fenvalerato y flucitrinato. De manera que no se pudo confirmar la identidad de este fotoproducto: podría tratarse del 3-fenoxibenzaldehído, del hidrox(3-fenoxifenil)acetonitrilo, o incluso de ambos.

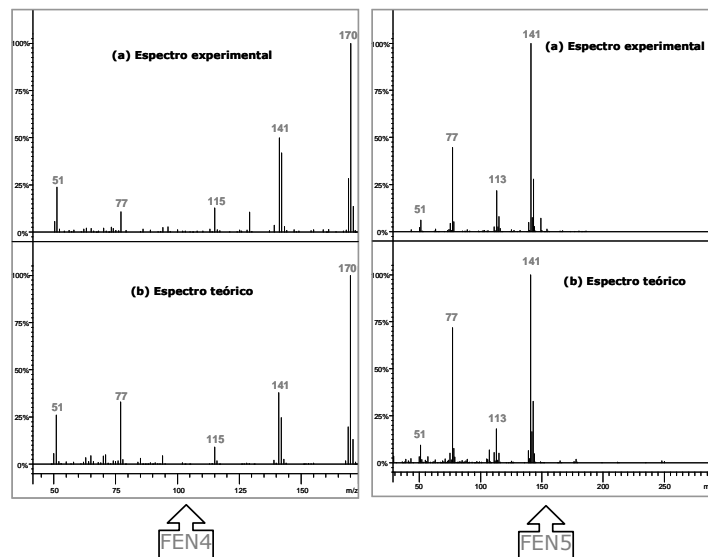


Figura IV.4.54 Espectros de masas experimentales y teóricos de FEN 4 y FEN 5.

Para la identificación de aquéllos fotoproductos de los que no se dispone del correspondiente espectro de masas teórico, se recurrió a la interpretación del perfil de fragmentación observado en sus espectros de masas obtenidos experimentalmente. En las Figuras IV.4.55, IV.4.56 y IV.4.57 se ilustran los **espectros de masas y la justificación de iones experimentales** para dichos productos de fotodegradación.

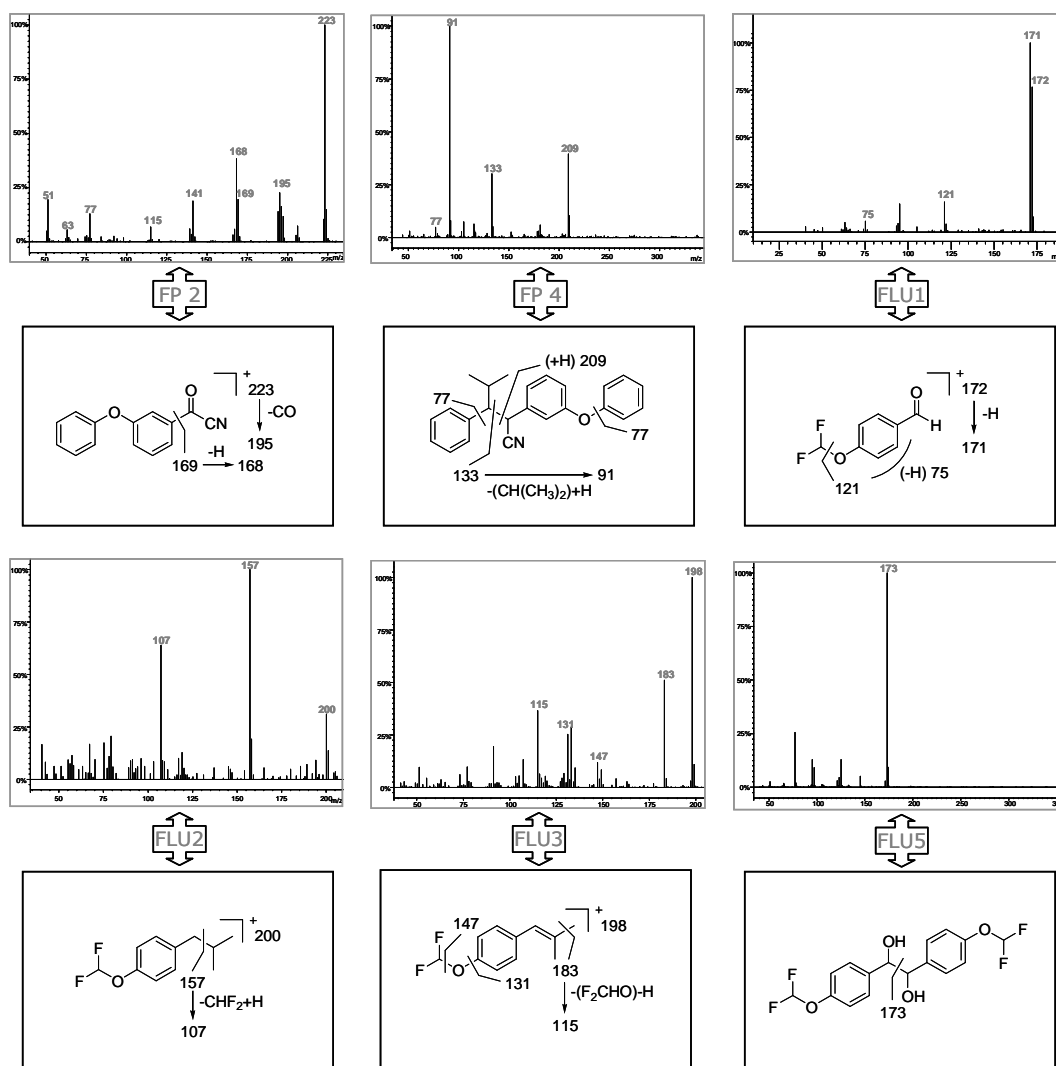


Figura IV.4.55 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de FP 2, FP 4, FLU 1, FLU 2, FLU 3 y FLU 5.

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

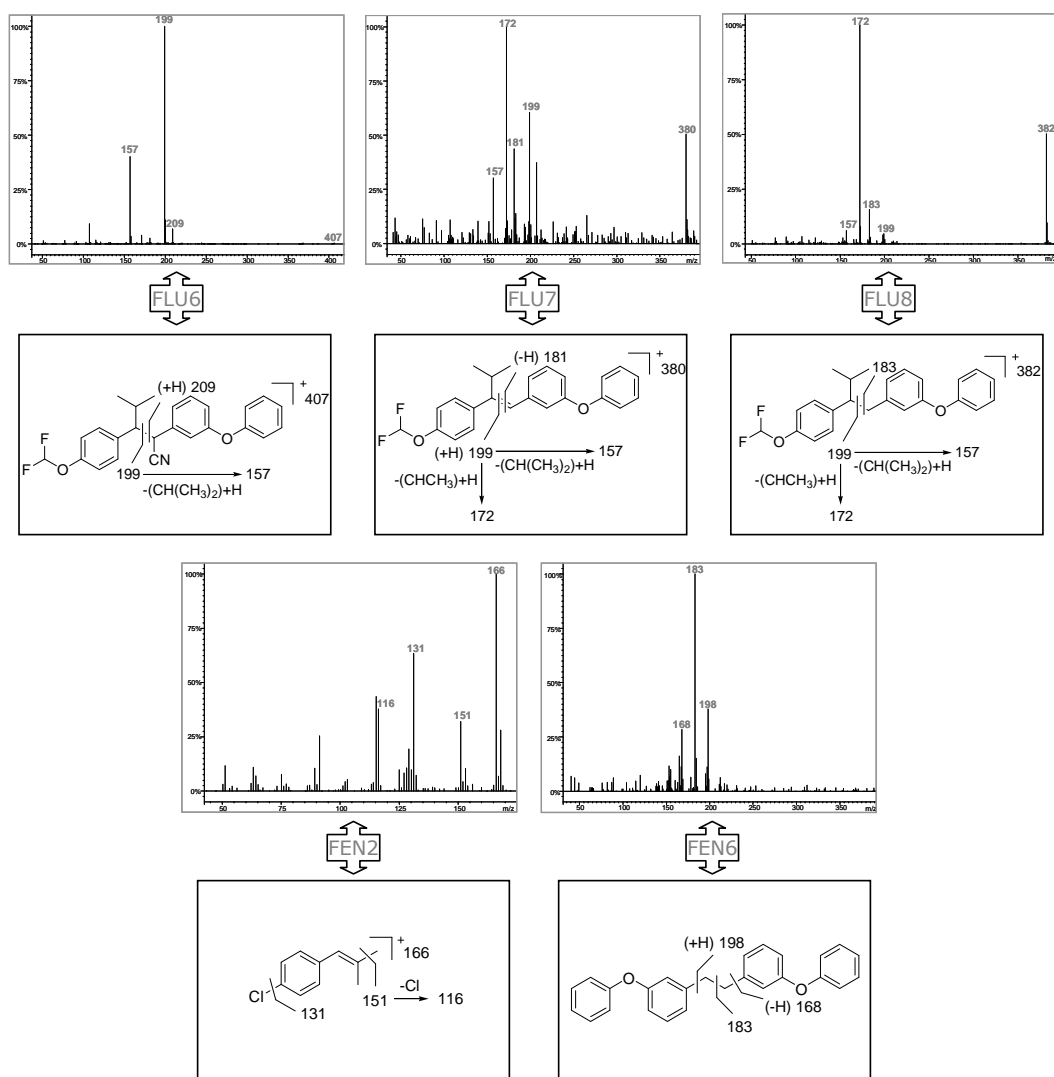


Figura IV.4.56 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de FLU 6, FLU 7, FLU 8, FEN 2 y FEN 6.

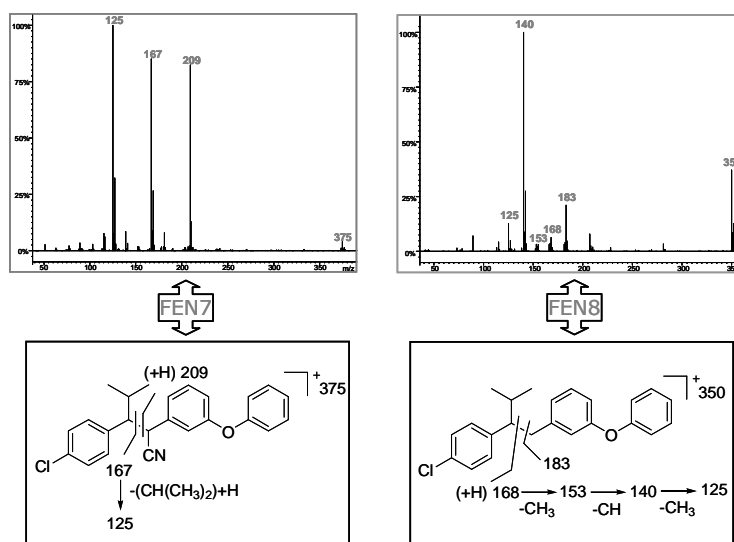


Figura IV.4.57 Espectros de masas y justificación de iones experimentales de FEN 7 y FEN 8.

Para la identificación de FEN 7 también se utilizaron datos espectrales disponibles en la bibliografía [35]. Además, en el caso de los fotoproductos clorados del fenvalerato (FEN 2, FEN 7, FEN 8), la localización de *clusters* característicos de la presencia de un átomo de Cl proporcionó una información clave.

Por otro lado, el hecho de que fenvalerato y flucitrinato presenten estructuras muy similares resultó de gran ayuda durante el proceso identificativo de los fotoproductos, ya que productos de degradación equivalentes mostraron patrones de fragmentación análogos (p.ej. FLU 8 y FEN 8; FLU 3 y FEN 2). Otro ejemplo es el de los fotoproductos FEN 5 y FLU 5: la estructura de FEN 5, 1,2-bis(4-clorofenil)etano-1,2-diol, se propuso ya que el espectro experimental coincide con el encontrado en la librería (Figura IV.4.54); en el caso del fotoproducto análogo del flucitrinato (FLU 5), 1,2-bis(4-(difluorometoxi)fenil)etano-1,2-diol, tan solo se pudo justificar un ion experimental (m/z 173, ver Figura IV.4.55), sin embargo esta asignación es plausible dada la similitud entre los perfiles de fragmentación de este fotoproducto (para el cual no se dispone del espectro teórico) y FEN 5.

Mención aparte merecen los fotoproductos FEN 3 y FLU 4. FEN 3 se identificó tentativamente como 1-(4-clorofenil)-2-metilpropan-1-ona sobre la base del espectro teórico de su isómero 1-(4-clorofenil)butan-1-ona (Figura IV.4.58). Además, en el

espectro de masas experimental de FEN 3 se localizó el hipotético ion molecular de este fotoproducto (m/z 182). Por analogía entre el comportamiento fotoquímico de fenvalerato y flucitrinato, en principio se pensó que FLU 4 pudiera tratarse del 1-(4-difluorometoxifenil)-2-metilpropan-1-ona. Sin embargo, en este caso no se detectó el ion molecular correspondiente (m/z 214) por lo que se descartó dicha asignación. Así, finalmente, FLU 4 se identificó tentativamente como 1,2-bis(4-(difluorometoxi)fenil)etano-1,2-diona basándose en la justificación del patrón de fragmentación observado en el espectro de masas obtenido experimentalmente (Figura IV.4.58).

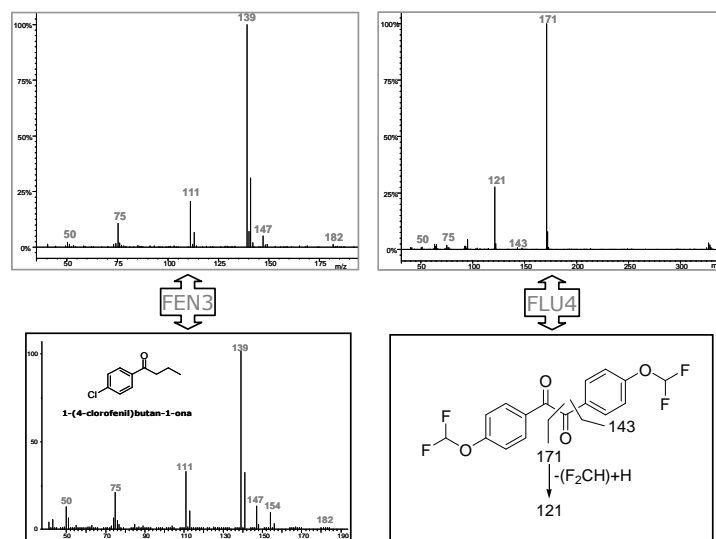


Figura IV.4.58 Espectros de masas experimentales de los fotoproductos FEN 3 y FLU 4 e identificación de los mismos.

Finalmente, el fotoproducto FP 3 fue identificado tentativamente como 2,3-bis(3-fenoxifenil)succinonitrilo. Su identificación se basó en las similitudes entre su espectro de masas experimental y el espectro de masas teórico del 3-(fenoxifenil)acetonitrilo (Figura IV.4.59), que es el "monómero" de FP 3 y que también ha sido detectado como fotoproducto de ambos piretroides en estudios anteriores [32, 33, 36-39]. De hecho, el 3-(fenoxifenil)acetonitrilo se detectó (tanto en la fibra sin exponer como en la fibra expuesta a la radiación UV) con un tiempo de retención de 12,63 min, pero no se puede considerar como fotoproducto puesto que no se apreció un incremento evidente en la respuesta con el tiempo de exposición.

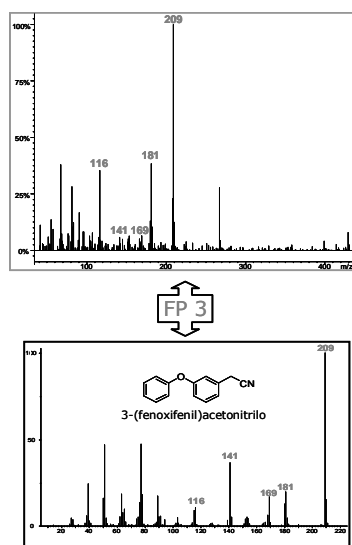


Figura IV.4.59 Espectro de masas experimental de FP 3 y espectro teórico de su "monómero".

Las **rutas de fotodegradación** propuestas para los piretroides investigados se muestran en las Figuras IV.4.60 y IV.4.61. Además de los fotoproductos sugeridos, en este caso se ha profundizado algo más en los mecanismos de las fotorreacciones y, por lo tanto, también se han postulado radicales intermedios (designados con el prefijo R). Estas rutas se han construido sobre la base de los productos de fotodegradación identificados, pero también con la ayuda de trabajos previos en los que se han discutido con detalle los mecanismos y los radicales que intervienen en la degradación fotoquímica del fenvalerato y del flucitrinato [33, 36, 38-40].

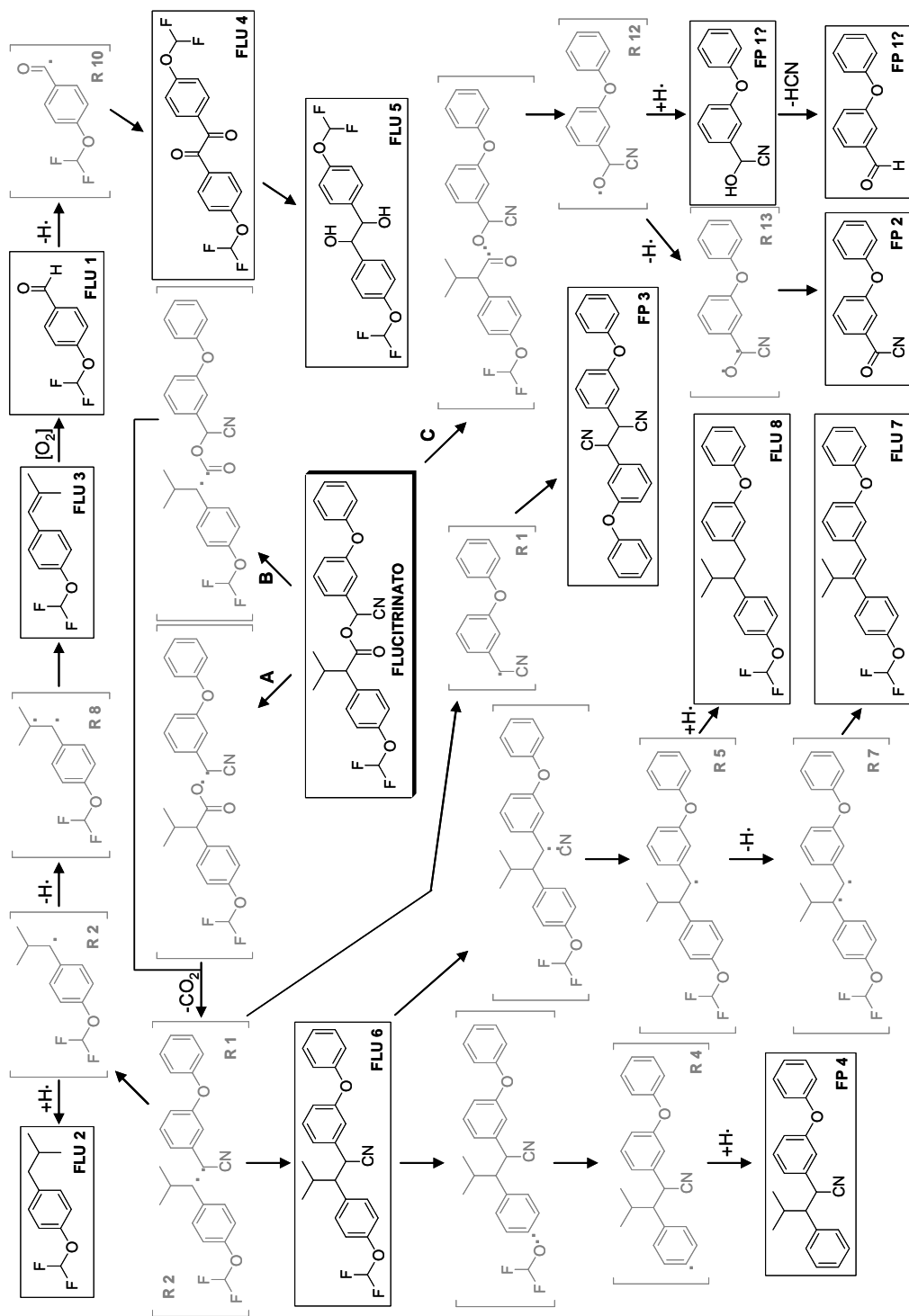


Figura IV.4.60 Rutas de fotodegradación propuestas para el flucitrinato.

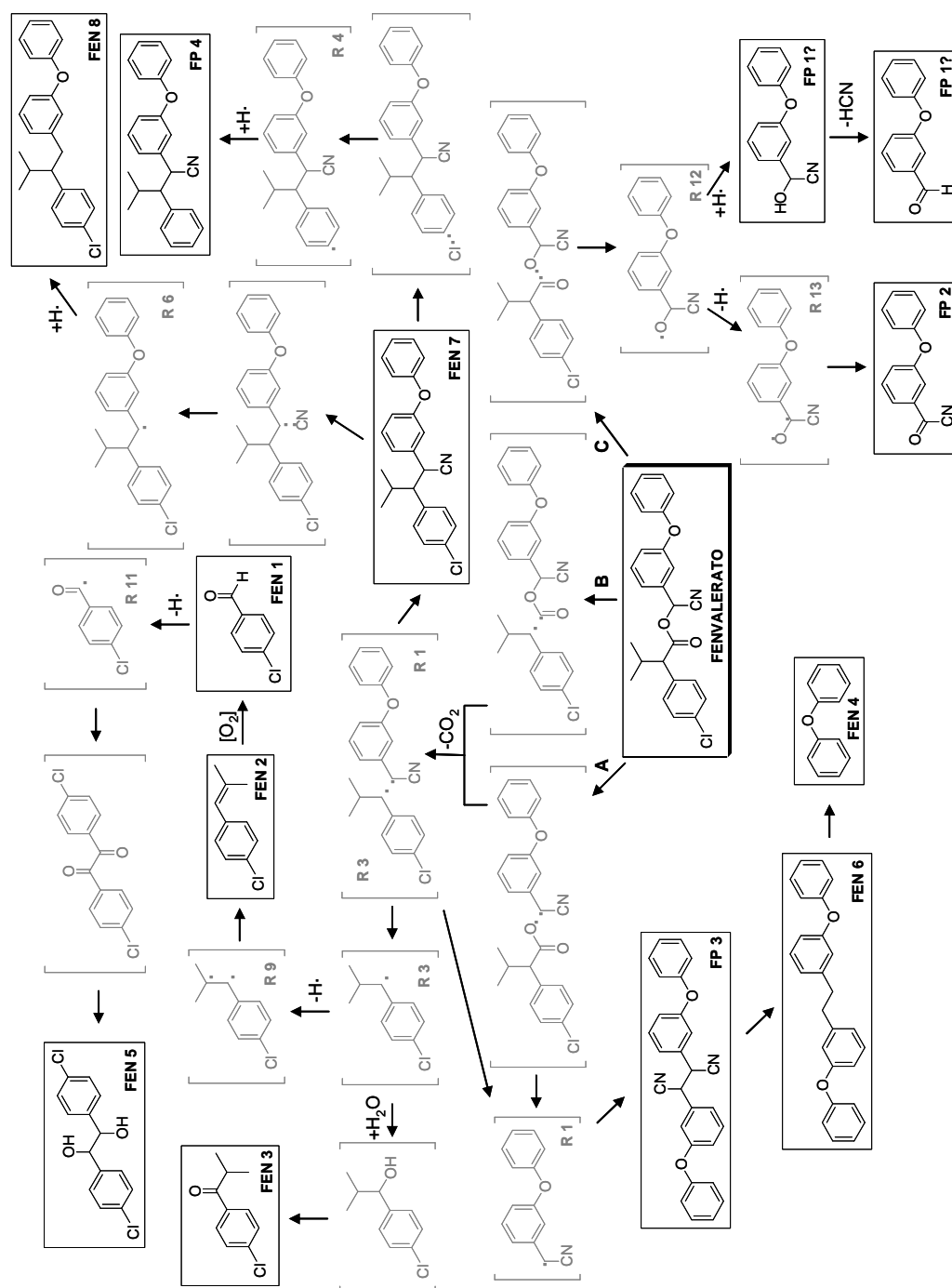


Figura IV.4.61 Rutas de fotodegradación propuestas para el fenvalerato.

En los siguientes apartados se discutirán conjuntamente las rutas de fotodegradación de ambos piretroides. Tal y como se deduce de las Figuras IV.4.60 y IV.4.61, todos los fotoproductos identificados implican la **ruptura del enlace éster**; sin embargo, tras la ruptura de este enlace, se puede liberar CO_2 obteniéndose de esta manera dos radicales bencílicos que, recombinados, pueden conducir a la generación del correspondiente piretroide decarboxilado. A su vez, este producto decarboxilado puede degradarse; por lo tanto, por un lado se estudiará la decarboxilación de los piretroides y las rutas relacionadas. Por otro lado, se considerarán separadamente los fotoproductos asociados con las partes ácida y básica de los piretroides éster investigados.

4.4.3.1 Decarboxilación y rutas relacionadas

Seis compuestos han sido tentativamente identificados como fotoproductos que se podrían generar por **pérdida de CO_2 y por pérdidas posteriores de otros fragmentos** de la molécula de partida: FP 4, FLU 6-8, FEN 7-8.

Algunos autores [36, 38] han propuesto la ruptura del enlace C-O en posición bencílica (**ruta A**) como etapa previa a la rápida decarboxilación del fenvalerato (Figura IV.4.61) mientras que, recientemente, también se ha sugerido una ruptura homolítica (Norrish tipo I) del enlace CO-(i-Pr) (**ruta B**) [40]. A pesar de que la información acerca de las rutas fotoquímicas del flucitrinato es más limitada [33], se pueden asumir mecanismos similares (Figura IV.4.60). Independientemente de cuál sea el mecanismo (ver Figuras IV.4.60 y IV.4.61), la pérdida subsiguiente de CO_2 conduciría a la generación de dos radicales bencílicos (R 1 y R 2 para el flucitrinato, R 1 y R 3 para el fenvalerato). La recombinación de estos pares de radicales puede llevar a la generación de los piretroides decarboxilados (**FLU 6** y **FEN 7**) los cuales pueden perder F_2CHO y Cl, respectivamente, para formar el radical R 4 que, a su vez, puede captar un átomo de hidrógeno dando lugar al fotoproducto **FP 4**. De modo similar, los fotoproductos **FLU 8** y **FEN 8** pueden surgir si los radicales R 5 y R 6 (generados por ruptura del enlace CH-CN en los piretroides decarboxilados), respectivamente, captan un átomo de hidrógeno de alguna molécula vecina. Finalmente, **FLU 7** se puede originar a partir del radical R 7 que se podría generar si R 5 perdiera un átomo de hidrógeno.

FLU 6 (decarboxi-flucitrinato) y **FEN 7** (decarboxi-fenvalerato) ya habían sido propuestos con anterioridad como fotoproductos del flucitrinato y del fenvalerato [32, 33, 35-42]. En ambos casos se han detectado dos picos cromatográficos con el mismo espectro de masas, por lo que se ha asumido que estos picos corresponden a **mezclas isoméricas** (ver Figura IV.4.62 para FLU 6). También se obtuvieron varios isómeros del fotoproducto **FP 4**, que ya había sido previamente detectado como producto de fotodegradación del fenvalerato [36].

En la Figura IV.4.62 se muestran los **cromatogramas** obtenidos para FLU 6 y FLU 7 a diferentes tiempos de irradiación de la fibra. Además, se han incluido las correspondientes **cinéticas de fotoformación-fotodegradación** para dichos fotoproductos. De esta figura se deduce que la generación de FLU 6 es muy rápida, alcanzando su máximo alrededor de los 10 min de irradiación; sin embargo, la formación de FLU 7 es más tardía (máximo en torno a 30 min). Estos comportamientos podrían justificarse teniendo en cuenta que lo más probable es que, mientras FLU 6 se genera a partir del flucitrinato, FLU 7 no lo hace directamente a partir del insecticida, si no a partir de FLU 6.

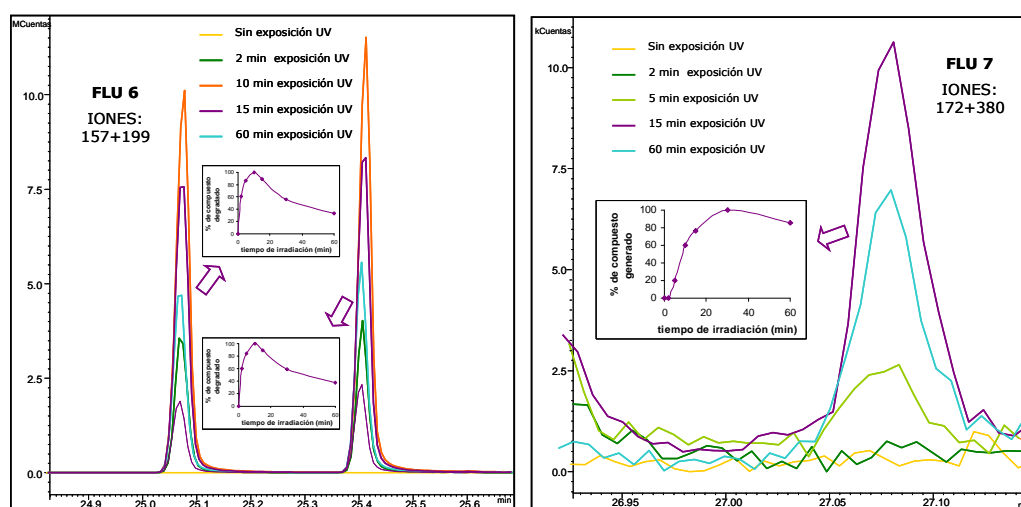


Figura IV.4.62 Superposición de cromatogramas por ion obtenidos a diferentes tiempos de irradiación y cinéticas de fotoformación-fotodegradación de FLU 6 y FLU 7.

4.4.3.2 Fotoproductos asociados con la parte ácida

A pesar de que la **ruptura fotolítica del enlace éster** de los piretroides investigados parece bastante obvia, ninguno de los ácidos carboxílicos correspondientes (ácido 2-(4-(difluorometoxi)fenil)-3-metilbutanoico y ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico) se detectaron bajo las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo sí que se encontraron e identificaron otros productos de fotodegradación asociados con la **parte ácida** de los insecticidas de partida: **FLU 1-5**, **FEN 1-3**, **FEN 5**. Es probable que todos ellos se generen a partir de los radicales 1-(4-clorofenil)-2-metil-1-propilo (**R 3**, ver Figura IV.4.61) y 1-(4-difluorometoxifenil)-2-metil-1-propilo (**R 2**, ver Figura IV.4.60).

R 2 y R 3 pueden perder un átomo de hidrógeno (R 8 y R 9, en la Figuras IV.4.60 y IV.4.61, respectivamente) y formar los alquenos **FEN 2** y **FLU 3**, respectivamente. A su vez, la oxidación de FEN 2 y FLU 3 puede conducir a la formación de **FEN 1** y **FLU 1**, respectivamente. Estos aldehídos podrían perder un átomo de hidrógeno dando lugar a los radicales R 10 y R 11, los cuales podrían dimerizar para generar una diona (no identificada en el caso del fenvalerato, **FLU 4** en el caso del flucitrinato), de cuya reducción podrían surgir los fotoproductos **FEN 5** y **FLU 5**.

Por otro lado, R 2 podría sustraer un átomo de hidrógeno para formar **FLU 2**; mientras que **FEN 3** se podría generar por reacción del radical R 3 con agua seguida de la oxidación del alcohol resultante.

Los fotoproductos FEN 1-3 del fenvalerato y FLU 2 del flucitrinato ya habían sido anteriormente propuestos por otros autores [33, 36, 39].

En la Figura IV.4.63 se muestra la superposición de los cromatogramas correspondientes a diferentes tiempos de irradiación y las cinéticas de los fotoproductos FLU 1 y FEN 1. En la figura se observa que ambos fotoproductos se forman muy rápidamente, alcanzando su máximo tras 5 min de irradiación, apreciándose a continuación una clara fotodegradación de los mismos.

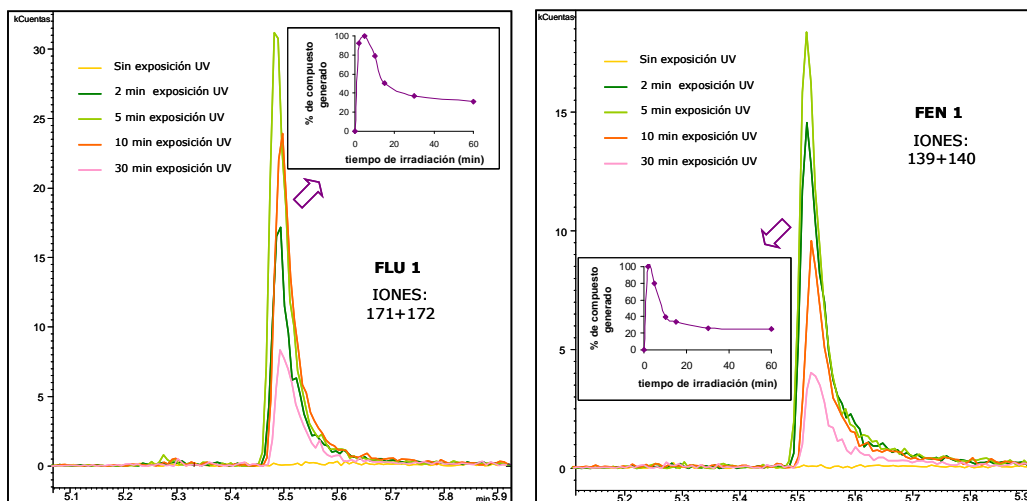


Figura IV.4.63 Superposición de los cromatogramas por ion obtenidos a diferentes tiempos de irradiación y cinéticas de fotoformación-fotodegradación de FLU 1 y FEN 1.

4.4.3.3 Fotoproductos asociados con la parte alcohol

Sobre la base de la bibliografía consultada [33, 36], se propuso otro mecanismo para la ruptura del enlace éster según el cual éste se rompe a través del enlace entre el carbono del grupo carbonilo y el átomo de oxígeno (**ruta C**) (ver Figuras IV.4.60 y IV.4.61). Todas las rutas sugeridas con origen en esta ruta C son comunes para ambos insecticidas: el radical asociado con la parte alcohol de la molécula (R 12) puede bien perder un átomo de hidrógeno (R 13) para después formar el 2-oxo-2-(3-fenoxifenil)acetonitrilo (**FP 2**) o bien captar un átomo de hidrógeno para generar 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrilo (**FP 1***), el cual podría eliminar HCN, formando el 3-fenoxibenzaldehído (**FP 1**). Estos tres compuestos (FP 1, FP 1* y FP 2) ya fueron identificados previamente como fotoproductos de fenvalerato y flucitrinato [32-34, 36-39].

Volviendo a las **rutas A y B**, los dímeros **FP 3** (2,3-bis(3-fenoxifenil)succinonitrilo) y **FEN 6** (1,2-bis(3-fenoxifenil)etano) se pueden formar a partir del radical α -ciano-3-fenoxibencilo (R 1), mientras que **FEN 4** (1-fenoxibenceno) se podría originar a partir de FEN 6, pero también a partir de otros fotoproductos conteniendo el grupo fenoxifenilo. FP 2 y FP 3 ya habían sido detectados previamente como fotoproductos

de ambos piretroides [33, 36, 39], al igual que FEN 6 como fotoproducto del fenvalerato [36].

En la Figura IV.4.64 se muestran los cromatogramas obtenidos para la fibra sin exponer y para diferentes tiempos de exposición a la luz UV, además de las cinéticas de los fotoproductos FP 1 y FEN 4. En esta figura se observa que ambos fotoproductos ya estaban presentes en los experimentos control (0 min de irradiación), probablemente como impurezas de las mezclas isoméricas originales; sin embargo, estos compuestos se pueden considerar igualmente fotoproductos puesto que se apreció un claro incremento en su concentración con el tiempo de irradiación.

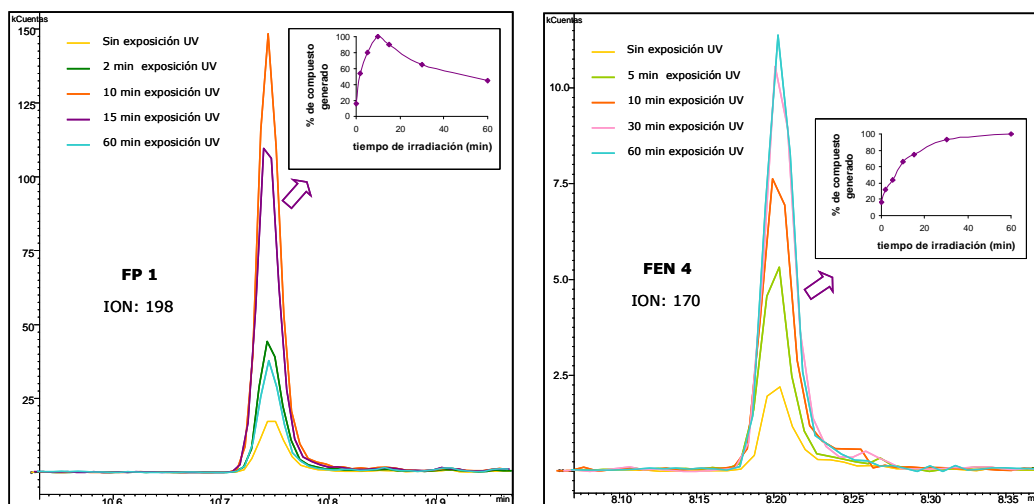


Figura IV.4.64 Superposición de los cromatogramas por ion obtenidos a diferentes tiempos de irradiación y cinéticas de fotoformación-fotodegradación de FP 1 y FEN 4.

4.5 TOXICIDAD DE LOS FOTOPRODUCTOS

Uno de los aspectos más importantes relacionados con la fotodegradación de los pesticidas en particular, y de los contaminantes medioambientales en general, es el posible factor de riesgo asociado con la **toxicidad** de los productos de su degradación. En este sentido se ha realizado un **estudio bibliográfico** relacionado con la posible toxicidad de los fotoproductos identificados en este trabajo.

Por una parte, se han publicado trabajos según los cuales ciertos productos de degradación medioambiental de piretroides son motivo de preocupación por su habilidad para interactuar con receptores hormonales. Así, Tyler y col. [43] observaron que el **(3-fenoxifenil)metanol (P 4, F 18)** presenta actividades estrogénica y antiandrogénica, mientras que los **ácidos 3-fenoxibenzoico (P 10) y 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico (P 1, F 5)** poseen actividades antiestrogénicas. Estos autores concluyeron que dichos productos de degradación son previsiblemente más potentes como disruptores endocrinos que otros piretroides como son la permetrina, la ciflutrina y la cipermetrina. Además, McCarthy y col. [44] investigaron la estrogenicidad de varios metabolitos de piretroides, algunos de los cuales también se forman como consecuencia de la degradación en el medioambiente de estos pesticidas. Los resultados de este trabajo mostraron que el **(3-fenoxifenil)metanol (P 4, F 18)** y el **3-fenoxibenzaldehído (P 3, F 16, FP 1)** pueden interactuar con receptores de estrógenos humanos y que, a pesar de que no exista evidencia de que dichos compuestos afecten de manera significativa a los seres humanos, sí podrían tener un mayor impacto en otros animales.

Además, la formación de **dibenzofuranos** como fotoproductos de la ciflutrina (**P 16 y P 17**) podría ser preocupante puesto que el dibenzofurano ha sido calificado por la EPA como contaminante peligroso, dada su persistencia en el medioambiente, su potencial de bioacumulación y su toxicidad tanto para los humanos como para el medioambiente en general [45].

Por otro lado, se ha demostrado que el **2-oxo-2-(3-fenoxifenil)acetonitrilo (FP 2)** (LD_{50} para ratones de 22 mg/kg) es considerablemente más tóxico que el fenvalerato del que procede ($LD_{50} > 500$ mg/kg); y que, además, los síntomas observados en ratones expuestos a este compuesto son similares a aquéllos por envenenamiento con cianuro [36, 46].

Finalmente, en otro estudio se investigaron las actividades genotóxicas y teratogénicas del **1-fenoxibenceno (FEN 4)** y se apreció una toxicidad severa de este compuesto en todos los organismos evaluados, a niveles de concentración iguales o por encima de 10^{-5} M [47].

En este estudio se ha obtenido una gran cantidad de información acerca del **comportamiento fotoquímico** de doce insecticidas piretroides y de un sinergista mediante **foto-SPME**, empleando el acoplamiento **GC-MS** como técnica de análisis. Hasta el momento, no se tiene conocimiento de otros trabajos anteriores sobre la fotodegradación de dos de los insecticidas investigados (empentrina y cifenotrina); además, la información publicada acerca de la fotoquímica de otros piretroides como la tranflutrina o la ciflutrina es muy limitada.

Se ha demostrado que la fotodegradación en fibra de todos los analitos estudiados se ajusta a un modelo cinético de **primer orden**. Además, mediante **experimentos rápidos y verdes** se han podido corroborar fotoproductos propuestos por otros autores y se han propuesto fotoproductos identificados por vez primera en el presente trabajo.

Finalmente se han sugerido **rutas de fotodegradación** para los compuestos investigados y se ha observado que las **reacciones de fotodecomposición** más comunes de los piretroides son: isomerización, decarboxilación, ruptura del enlace éster, dehalogenación reductiva y formación de 3,3-dimetilacrilatos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Casas, V.; Llompart, M.; Garcia-Jares, C.; Cela, R. Dagnac, T. Effects of sample pretreatment and storage conditions in the determination of pyrethroids in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 1841-1849.
- [2] Holmstead, R.L.; Casida, J.E.; Ruzo, L.O.; Fullmer, D.G. Pyrethroid photodecomposition: Permethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 590-595.
- [3] Chen, Z.M.; Zabik, M.J.; Leavitt, R.A. Comparative study of thin film photodegradative rates for 36 pesticides. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1984**, 23, 5-11.
- [4] Raikwar, M.K.; Nag, S.K. Phototransformation of α -cypermethrin as thin film on glass and soil surface. *J. Environ. Sci. Health., Part B* **2006**, 41, 973-988.

- [5] Segal-Rosenheimer, M.; Dubowski, Y. Photolysis of thin films of cypermethrin using in situ FTIR monitoring: Products, rates and quantum yields. *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, 200, 262-269.
- [6] Ruza, L.O.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: mechanistic aspects in reactions of dihalovinylcyclopropanecarboxylate substituents. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1980**, 1, 728-732.
- [7] Ruza, L.O.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: Intramolecular sensitization and photoreactivity of 3-phenoxybenzyl, 3-phenylbenzyl, and 3-benzoylbenzyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 963-966.
- [8] Rawn, G.P.; Webster, G.R.B.; Muir, D.C.G. Fate of permethrin in model outdoor ponds. *J. Environ. Sci. Health* **1982**, 17, 463-486.
- [9] Ruza, L.O.; Krishnamurthy, V.V.; Casida, J.E.; Gohre, K. Pyrethroid photochemistry: Influence of the chloro(trifluoromethyl)vinyl substituent in cyhalothrin. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 879-883.
- [10] Curl, E.A.; Leahey, J.P.; Lloyd, S.J. PP321: Aqueous photolysis at pH 5. **1984** (Unpublished proprietary report No. RJ0362B, submitted to WHO by ICI).
- [11] Curl, E.A.; Leahey, J.P.; Lloyd, D. PP321: Photodegradation on a soil surface **1984** (Unpublished proprietary report No. RJ0358B, submitted to WHO by ICI).
- [12] U.S. Environmental Protection Agency. *Environmental Fate Assessment for the Synthetic Pyrethroids.* <<http://www.epa.gov/scipoly/SAP/meetings/1999/february/pyreth.pdf>> (Consulta: 10-06-09)
- [13] Day, S.R.; Leahey, J.P. ¹⁴C-cypermethrin: aqueous photodegradation in sunlight. *Fernhurst, Imperial Chemical Industries* **1980** (Unpublished ICI Report No. RJ0154B).
- [14] Hall, J.S.; Leahey, J.P.; Curl, E.A. Cypermethrin: photodegradation on a soil surface. *Fernhurst, Imperial Chemical Industries* **1981** (Unpublished ICI Report No. RJ0192B).
- [15] Ruza, L.O. Involvement of oxygen in the photoreactions of cypermethrin and other halogenated pyrethroids. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 1113-1115.
- [16] Takahashi, N.; Mikami, N.; Matsuda, T.; Miyamoto, J. Hydrolysis of the pyrethroid insecticide cypermethrin in aqueous media. *J. Pestic. Sci.* **1985**, 10, 643-648.

- [17] Ruza, L.O.; Holmstead, R.L.; Casida, J.E. Solution photochemistry of the potent pyrethroid insecticide α -cyano-3-phenoxybenzyl-cis-2,2-dimethyl-3-(2,2-dibromovinyl)cyclopropanecarboxylate. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 35, 3045-3048.
- [18] Ruza, L.O.; Holmstead, R.L.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: Decamethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 1385-1394.
- [19] Maguire, R.J. Chemical and photochemical isomerization of deltamethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1613-1617.
- [20] Hall, J.S.; Leahey, J.P. Cyhalothrin: Fate in river water. **1983** (*Unpublished proprietary report No. RJ0320B, submitted to WHO by ICI*).
- [21] Bowman, H.; Carpenter, M. Determination of photodegradation of ^{14}C -deltamethrin in aqueous solution. **1987** (*Unpublished proprietary report ABC LABS 35491, submitted to WHO by Roussel Uclaf*).
- [22] Ruza, L.O.; Smith, I.H.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: photooxidation reactions of the chrysanthemates phenothrin and tetramethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 110-115.
- [23] Draper, W.M. Near UV quantum yields for rotenone and piperonyl butoxide. *Analyst* **2002**, 127, 1370-1374.
- [24] Isobe, N.; Matsuo, M.; Miyamoto, J. Novel photoproducts of allethrin. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 861-864.
- [25] Ruza, L.O.; Gaughan, C.; Casida, J.E. Pyrethroid photochemistry: S-Bioallethrin. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 246-249.
- [26] Evaluation on: transfluthrin use as a public hygiene insecticide, Advisory Committee on Pesticides, York, UK, **1997**.
- [27] Kawano, Y.; Yanagihara, K.; Miyamoto, T.; Yamamoto, I. Examination of the conversion products of pyrethrins and allethrin formulations exposed to sunlight by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1980**, 198, 317-328.
- [28] Fishbein, L.; Gaibel, Z.L.F. Photolysis of pesticidal synergists. I. Piperonyl butoxide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1971**, 5, 546-552.
- [29] Piperonyl butoxide photodegradation on soil. *Huntingdon Research Centre Lit. Study No. PBT 6* **1995**, Unpublished.

- [30] Selim, S. Isolation and identification of major degradates of piperonyl butoxide (PBO) following aqueous photolysis. *Biological Test Center Study No. P059410* **1995**, Unpublished.
- [31] Harbach, C.A.J. GC/EIMS analysis of PBO exposed to UV light in the presence and absence of moisture (Certificate of Analysis). *M-Scan Ltd. Study No. 9506/7804* **1995**, Unpublished.
- [32] Katagi, T. Photodegradation of esfenvalerate in clay suspensions. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 2178-2183.
- [33] Chattopadhyaya, S.; Dureja, P. Photolysis of flucythrinate. *Pestic. Sci.* **1991**, 31, 163-173.
- [34] Dureja, P.; Chattopadhyay, S.; Photodegradation of pyrethroid insecticide flucythrinate in water and on soil surface. *Toxicol. Environ. Chem.* **1995**, 52, 97-102.
- [35] Holmstead, R.L.; Fullmer, D.G. Photodecarboxylation of cyanohydrin esters. Models for pyrethroid photodecomposition. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 56-58.
- [36] Holmstead, R.L.; Fullmer, D.G.; Ruzo, L.O. Pyrethroid photodecomposition: Pydrin. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 954-959.
- [37] Mikami, N.; Takahashi, N.; Hayashi, K.; Miyamoto, J. Photodegradation of fenvalerate (Sumicidin). *J. Pest. Science* **1980**, 5, 225-236.
- [38] Katagi, T. Photodegradation of the pyrethroid insecticide esfenvalerate on soil, clay minerals, and humic acid surfaces. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1351-1356.
- [39] Suzuki, Y.; Katagi, T. Novel fluorescence detection of free radicals generated in photolysis of fenvalerate. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 10811-10816.
- [40] Sanjuan, A.; Aguirre, G.; Alvaro, M.; Garcia, H.; Scaiano, J.C.; Chretien, M.N.; Focsaneanu, K.S. Product studies and laser flash photolysis of direct and 2,4,6-triphenylpyrylium-zeolite Y photocatalyzed degradation of fenvalerate. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 955-959.
- [41] Takahashi, N.; Mikami, N.; Matsuda, T.; Miyamoto, J. Photodegradation of the [2S, αS] isomer of fenvalerate in distilled water. **1985** (*Unpublished report No. LLM-50-0001 submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd*).

- [42] Katagi, T.; Mikami, N.; Matsuda, T.; Miyamoto, J. Photodegradation of fenvalerate and esfenvalerate on soil. **1985** (*Unpublished report No. LLM-50-0005 submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd*).
- [43] Tyler, C.R.; Beresford, N.; van der Woning, M.; Sumpter, J.P.; Thorpe, K. Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, 19, 801-809.
- [44] McCarthy, A.R.; Thomson, B.M.; Shaw, I.C.; Abell, A.D. Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *J. Environ. Monit.* **2006**, 8, 197-202.
- [45] <<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/di-furan.html#ref3>> (Consulta: 10-06-09)
- [46] Ohkawa, H.; Ohkawa, R.; Yamamoto, I.; Casida, J.E. Enzymatic mechanisms and toxicological significance of hydrogen cyanide liberation from various organothiocyanates and organonitriles in mice and houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1972**, 2, 95-112.
- [47] Pagano, G.; Esposito, A.; Giordano, G.G.; Vamvakinos, E.; Quinto, I.; Bronzetti, G.; Bauer, C.; Corsi, C.; Nieri, R.; Ciajolo, A. Genotoxicity and teratogenicity of diphenyl and diphenyl ether: a study of sea urchins, yeast, and *Salmonella typhimurium*. *Terat. Carcinog. Mutag.* **1983**, 3, 377-393.

V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

La primera parte de esta Tesis se ha centrado en el desarrollo de **procedimientos de preparación de muestra** para la determinación de diferentes familias de fitosanitarios en muestras ambientales y agroalimentarias.

Se puede afirmar que para las matrices estudiadas (suelo, pienso y leche), todas ellas de una gran complejidad, se han desarrollado **métodos sencillos** de preparación de muestra que suponen, en comparación con los procedimientos clásicos, una **reducción importante en el coste de los análisis** tanto en lo que respecta al tiempo requerido, como en lo que se refiere al consumo de disolventes orgánicos. Debido a la baja generación de residuos, las metodologías propuestas se pueden calificar como **respetuosas con el medioambiente**. Además, también es interesante destacar que en todos los casos se han manejado tamaños de muestra reducidos: suelo (0,5 g), pienso (1 g) y leche (1 mL).

Para la **optimización** de las variables que afectan a los procesos de extracción se han empleado herramientas quimiométricas. Así, utilizando **diseños experimentales** se han conocido los factores más influyentes en cada uno de los procesos de extracción investigados, se ha evaluado la influencia de las interacciones entre factores, y se han determinado las condiciones óptimas minimizando el número de experimentos requeridos.

Por otro lado, las **prestaciones analíticas** del conjunto de metodologías desarrolladas como son la linealidad, la exactitud, la precisión y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), son muy satisfactorias. Es importante resaltar que tanto los LODs como los LOQs conseguidos están por debajo de los **límites legales** establecidos por la legislación española y europea en las diferentes matrices investigadas. Además, se ha demostrado la aplicabilidad de dichos métodos al análisis de **muestras reales**.

En lo que se refiere a los fitosanitarios encontrados en las muestras reales analizadas, los compuestos que más veces se detectaron fueron los pesticidas organoclorados, la mayoría de los cuales están prohibidos desde hace años pero todavía están presentes en el medioambiente debido a su gran persistencia. Aunque no tan frecuentemente, en algunas de las muestras analizadas también se detectaron organofosforados y piretroides. Son excepcionales los casos en los que los niveles detectados de estos

pesticidas superaron los límites legales establecidos. En cuanto a las muestras de leche, salvo en un caso puntual, no se encontró ninguno de los pesticidas estudiados, por lo que se puede concluir que la leche de las explotaciones ganaderas incluidas en este estudio está exenta de los fitosanitarios investigados.

Finalmente, es importante destacar la **novedad** de estos estudios, siendo la primera vez que se aplican las técnicas de SPME, MSPD y PSE al análisis de una parte importante de los pesticidas estudiados en las matrices consideradas.

En la segunda parte de esta Tesis se ha estudiado la **fotodegradación** de doce piretroides y de un sinergista (butóxido de piperonilo) mediante **foto-SPME**. Puesto que en la fotodegradación en fibra los fotoproductos se generan *in situ*, se ha evitado la necesidad de procedimientos de extracción largos y tediosos posteriores a la etapa de irradiación y, consecuentemente, se ha eliminado por completo el uso de disolventes orgánicos.

Así, a través de experimentos **rápidos y sencillos** que permiten el análisis simultáneo de todo el sistema (compuestos primarios y fotoproductos), se ha obtenido una cantidad considerable de información acerca del **comportamiento fotoquímico** de los analitos estudiados. Esto ha sido especialmente importante para dos de los insecticidas investigados como son la empentrina y la cifenotrina de los cuales no se había publicado hasta el momento ningún trabajo acerca de su fotodegradación.

En los siguientes apartados se enumerarán con más detalle las conclusiones extraídas de cada uno de estos estudios llevados a cabo.

1. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN SUELO

- Se ha desarrollado un método basado en la HSSPME que permite la determinación de un elevado número de pesticidas en suelo, utilizando el acoplamiento GC- μ ECD como técnica de análisis.
- Se trata del primer estudio en el que se ha utilizado la SPME para la extracción de piretroides de esta matriz.
- La metodología propuesta no requiere un tratamiento previo de la muestra.
- Tanto la temperatura como la fibra resultaron ser las variables más influyentes en la eficacia de la extracción, y los mejores resultados se obtuvieron trabajando a 100 °C y utilizando una fibra de PA.
- Se ha demostrado que el método de HSSPME-GC- μ ECD desarrollado es preciso y que las respuestas para los analitos investigados son lineales en el rango de concentraciones evaluado; además, los límites de detección están por debajo del ng g^{-1} , es decir, son inferiores a los niveles de referencia genéricos establecidos en suelo por la legislación española.
- En la evaluación de la exactitud del método se obtuvieron buenas recuperaciones (>70% en la mayoría de los casos).
- Las limitaciones del análisis cuantitativo derivadas del efecto matriz del suelo se pueden solventar utilizando el método de las adiciones estándar.
- Empleando el método propuesto se analizaron un total de 50 muestras de suelo reales. Todas ellas dieron positivo para alguno de los analitos estudiados pero, salvo en dos suelos en los que se detectó dieldrina a niveles de 14 y 19 ng g^{-1} , en los restantes casos los pesticidas se encontraron a concentraciones inferiores a los niveles de referencia genéricos establecidos por la legislación española.

2. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN PIENSO

- Se han desarrollado dos métodos que permiten la determinación de más de 30 fitosanitarios en pienso de ganado. Uno de ellos está basado en la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y el otro en la extracción con

disolventes presurizados (PSE). Como técnica de separación y detección se ha empleado GC- μ ECD.

- Es la primera vez que se aplican ambas técnicas al análisis de un número importante de los pesticidas estudiados en muestras de alimentación animal.
- La naturaleza del adsorbente empleado como co-columna ha sido la variable más importante en las extracciones por MSPD, consiguiéndose mejores resultados con Florisil.
- En las extracciones por PSE, la naturaleza del disolvente y el tamaño de muestra fueron los parámetros más influyentes siendo acetona:hexano (1:1, v/v) y 1 g, respectivamente, los niveles que condujeron a mayores recuperaciones.
- Las metodologías desarrolladas han permitido simplificar la preparación de muestra hasta tal punto que las etapas de extracción y limpieza se han llevado a cabo en un único paso.
- Tan sólo en el caso de muestras de pienso extremadamente complejas se ha requerido una etapa posterior de purificación de los extractos obtenidos mediante PSE.
- Con los dos procedimientos propuestos se han obtenido resultados comparables, con LODs y LOQs por debajo de los MRLs en pienso (y en los principales cultivos utilizados en su preparación) establecidos por la legislación europea. Además, ambos métodos se han validado en términos de precisión y exactitud, obteniéndose recuperaciones satisfactorias en la mayoría de los casos.
- Utilizando las metodologías desarrolladas se analizaron un total de 23 muestras de pienso de diferente composición. En algunas de estas muestras se detectaron trazas de aldehído de endrina, alacloro, fenitrothion, clorpirifos, endosulfán I, endosulfán II, sulfato de endosulfán y tetrametrina, pero sin que nunca se sobrepasaran los correspondientes MRLs. Sin embargo, en una de las muestras sí se detectó clorpirifos a una concentración de 71 ng g^{-1} , es decir, por encima del nivel permitido en maíz, trigo y semilla de soja. En otra muestra también se detectó fenitrothion a una concentración ligeramente superior (14 ng g^{-1}) al MRL en semilla de soja. Finalmente, el β -lindano se encontró en dos muestras a

una concentración (5,6-5,7 ng g⁻¹) superior al MRL en alimentos para ganado lechero.

3. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN LECHE

- Se ha desarrollado un procedimiento basado en la combinación de la microextracción en fase sólida con GC- μ ECD que permite la cuantificación de los pesticidas investigados en leche de vaca.
- Se trata de la primera aplicación de la SPME a la determinación de piretroides en leche.
- Las muestras de leche se analizaron sin necesidad de ninguna etapa de pretratamiento. Para la reducción de los efectos negativos derivados de la complejidad y lipofilicidad de la matriz estudiada, simplemente se recurrió a la dilución de las muestras con agua ultrapura.
- Se ha observado que las variables que más influyen en la eficacia de la extracción son el modo de muestreo, la agitación y la temperatura, y que las condiciones experimentales óptimas implican el muestreo directo (DSPME), la agitación constante y una temperatura de 100 °C.
- Se ha demostrado que el método propuesto es repetible, reproducible y lineal en el rango de concentraciones de interés.
- Se han conseguido límites de detección y cuantificación satisfactorios e inferiores a los MRLs establecidos en leche.
- Se ha observado que la eficacia de la extracción depende del contenido en grasa de la leche analizada, no obstante, las muestras analizadas se pudieron cuantificar mediante calibración externa empleando estándares *milk-matched*.
- Se demostró la aplicabilidad de la metodología propuesta mediante el análisis de 35 muestras de leche. En ninguna de ellas se encontraron los pesticidas objetivo, excepto en una en la que se detectó γ -clordano a un nivel de concentración por encima del MRL correspondiente.

4. FOTODEGRADACIÓN DE PIRETROIDES

- Se ha estudiado la fotodegradación de doce piretroides (λ -cihalotrina, permetrina, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina, empenetrina, aletrina, transflutrina, fenotrina, cifenotrina, fenvalerato y flucitrinato) y de un sinergista (butóxido de piperonilo) mediante foto-SPME-GC-MS.
- Se trata del primer trabajo en el que se estudia la fotodegradación de la empenetrina y la cifenotrina.
- Este estudio supone además una contribución importante al conocimiento del comportamiento fotoquímico de la transflutrina y la ciflutrina, puesto que la información publicada por otros autores al respecto es escasa.
- Se han trazado las curvas cinéticas de fotodegradación de los analitos y se ha comprobado que todas ellas se ajustan a un modelo cinético de primer orden.
- Se han identificado un elevado número de fotoproductos de los compuestos investigados, algunos de los cuales se han propuesto por vez primera en este trabajo.
- Se han postulado mecanismos de fotodegradación de los piretroides y del PBO en función de los fotoproductos identificados.
- Se ha visto que la isomerización, la ruptura del enlace éster, la formación de 3,3-dimetilacrilatos, la decarboxilación y la dehalogenación reductiva son rutas de fotodegradación habituales en los insecticidas estudiados.
- Se ha realizado una búsqueda bibliográfica acerca de la toxicidad y/o actividad biológica de los fotoproductos identificados y se ha concluido que algunos de estos compuestos podrían ser más potentes como disruptores endocrinos que los piretroides de los que proceden.

The first part of this Thesis focuses on the development of **sample preparation procedures** for the determination of multiclass pesticides in environmental and agro-food samples.

Simple methods of sample preparation have been developed for the studied matrixes (soil, cattle feed and milk), all of them of a great complexity, implying, if they are compared to the classical methodologies, a significant **reduction in the cost of the analyses** regarding both the required time and the organic solvent consumption. Due to the low generation of residues, the proposed methodologies can be described as **environmentally friendly**. Furthermore, it must be also pointed out the small sample size that has been handled in all cases: soil (0,5 g), cattle feed (1 g) and milk (1 mL).

Chemometric tools have been employed in order to **optimise** the variables affecting the extraction processes. In this manner, by using **experimental designs**, the most influential factors in each extraction process have been found, the influence of interactions between factors have been evaluated and the optimal conditions have been determined minimizing the required number of experiments.

On the other hand, the **analytical parameters** of the developed methodologies such as linearity, accuracy, precision and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) are very satisfactory. It is important to highlight that both LODs and LOQs are bellow the **legal limits** established by Spanish and European legislation in the investigated matrixes. Moreover, the applicability of such methods to the analysis of **real samples** has been demonstrated.

Regarding to the pesticides detected in the analyzed real samples, organochlorine pesticides were the most common detected compounds; most of such pesticides have been banned several years ago but they are still in the environment due to their high persistence. Organophosphorus and pyrethroid pesticides were also detected in some of the analyzed samples, but not so frequently. Detected levels were rarely above the established legal limits. With respect to the milk samples, except in one isolated case, none of the investigated compounds were found; thus, it can be concluded that the milk from the cattle farms included in the present study are free of the investigated pesticides.

Finally, it is important to emphasize the **newness** of these studies, since in the present work SPME, MSPD and PSE have been applied for the first time to the analysis of an important part of the studied pesticides in the considered matrixes.

In the second part of this Thesis the **photodegradation** of twelve pyrethroids and one synergist (piperonyl butoxide) has been studied by **photo-SPME**. In on-fiber photodegradation photoproducts are generated *in-situ*, thus, long and tedious extraction procedures after the irradiation step have been avoided and, consequently, organic solvent use has been completely deleted.

In this manner, through **rapid and simple** experiments which allow the simultaneous analysis of the whole system (primary compounds and photoproducts), a substantial amount of information about the **photochemical behaviour** of the studied compounds has been obtained. This has been especially important in the case of two of the investigated insecticides such as emperthrin and cyphenothrin, since no information about their photodegradation had been reported up to now.

In the following sections, conclusions drawn from each of the performed studies will be enumerated in detail.

1. DETERMINATION OF PESTICIDES IN SOIL

- A method based on HSSPME, using GC- μ ECD as analysis technique, was developed in order to determine a large number of pesticides in soil.
- This is the first study in which SPME has been employed to the extraction of pyrethroid insecticides from this matrix.
- The proposed methodology does not require sample pretreatment.
- Both temperature and fiber coating were the most significant variables affecting the extraction efficiency, and the best results were achieved at 100 °C employing a PA fiber.

- It has been demonstrated that the developed HSSPME-GC- μ ECD method is precise, providing linear responses for the investigated analytes over the range of concentrations considered; moreover, the limits of detection are at the sub-ng g⁻¹ level, that is, below the generic reference levels established by the Spanish legislation.
- Good recovery values (>70%, in most cases) were obtained in the accuracy assessment.
- Limitations for the quantitative analysis due to soil matrix effects can be overcome by using the standard addition procedure.
- 50 real soil samples were analyzed employing the proposed method. All these samples were positive for some of the studied analytes but, except for two soils in which dieldrin was detected at 14 and 19 ng g⁻¹ levels, in the remaining cases the pesticides were found at concentrations below the generic reference levels established by the Spanish legislation.

2. DETERMINATION OF PESTICIDES IN CATTLE FEED

- Two methods for the determination of more than 30 pesticides in cattle feed have been developed. One of them is based on the matrix solid phase dispersion (MSPD), and the other one on the pressurized solvent extraction (PSE). The coupling GC- μ ECD was employed as separation and detection technique.
- This is the first time that both extraction techniques have been applied to the analysis of an important portion of the target pesticides in animal feed samples.
- The type of adsorbent in the co-column has been the most important variable in the MSPD extractions, achieving better results by using Florisil.
- In the PSE extractions, the solvent nature and the sample size were the most influential parameters being acetone:hexane (1:1, v/v) and 1 g, respectively, the levels which led to higher recoveries.
- The developed methodologies have simplified the sample preparation to such an extent that extraction and clean-up stages have been performed in a single step.

- Only in the case of extremely complex feed samples, a postcleanup step was required in PSE extractions.
- Comparable results were obtained with both proposed procedures, with LODs and LOQs below the MRLs in animal feed (and in main crops employed in the preparation of cattle feeding materials) established by European legislation. Furthermore, both methods have been validated in terms of precision and accuracy, achieving satisfactory recoveries in most of cases.
- 23 cattle feed samples of different composition were analyzed by means of the developed methodologies. Traces of endrin aldehyde, alachlor, fenitrothion, chlorpyrifos, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulphate and tetramethrin were detected in some of these samples, but without exceeding the corresponding MRLs. Nevertheless, in one of the samples chlorpyrifos was detected at 71 ng g^{-1} , that is, at a concentration above the allowed level in maize, wheat and soya bean. In another sample, fenitrothion was also detected at a concentration a bit higher (14 ng g^{-1}) than the corresponding MRL in soya bean. Finally, β -lindane was found in two samples at a concentration ($5,6\text{-}5,7 \text{ ng g}^{-1}$) above the MRL in feedingstuffs for dairy cattle.

3. DETERMINATION OF PESTICIDES IN MILK

- A procedure based on solid-phase microextraction technique followed by GC- μ ECD which allows the quantification of the target pesticides in bovine milk has been developed.
- This is the first application of SPME for the determination of pyrethroid pesticides in milk.
- Milk samples could be extracted without the need for pretreatment. Negative matrix effects due to the complexity and lipophilicity of the studied matrix were reduced just by diluting the sample with ultrapure water.
- The most influential variables in the extraction efficiency were the sampling mode, the stirring and the temperature. The optimal experimental conditions involve the direct sampling mode (DSPME) at 100°C under constant stirring.

- The method was demonstrated to be reliable and linear in the concentration range of interest.
- LODs and LOQs were satisfactory and complied with the current MRLs of the target pesticides in milk.
- It was observed that extraction efficiency is fat content dependent; nevertheless, the analyzed samples could be quantified by means of external calibration performed with *milk-matched* standards.
- The applicability of the proposed methodology was demonstrated by the analysis of 35 milk samples. None of the target pesticides was detected in the analyzed samples, with exception of γ -chlordane which was detected in one milk sample at a concentration level above the corresponding MRL.

4. PHOTODEGRADATION OF PYRETHROIDS

- The photodegradation of twelve pyrethroids (λ -cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, empenethrin, allethrin, transfluthrin, phenothrin, cyphenothrin, fenvalerate and flucythrinate) and one synergist (piperonyl butoxide) has been studied by photo-SPME-GC-MS.
- There is no record of previous studies of cyphenothrin and empenethrin photodegradation.
- The present work also means an important contribution to the knowledge of the photochemical behaviour of transfluthrin and cyfluthrin, since the information reported by other authors is scarce.
- Kinetic curves of photodegradation have been traced and first-order kinetic behaviour has been demonstrated for all the analytes.
- A large number of photoproducts of the investigated compounds have been identified, and some of them have been proposed for the first time in the present work.
- On the basis of the identified photoproducts, photodegradation mechanisms of the pyrethroids and PBO have been postulated.
- It has been observed that isomerization, ester bond cleavage, 3,3-dimethylacrylate formation, decarboxylation and reductive dehalogenation are common photodegradation routes of the studied insecticides.

- A bibliographic search related to the toxicity and/or biological activity of the identified photoproducts has been performed, and it has been concluded that some of these compounds might be more powerful as endocrine disruptors than the parent pyrethroids.

ANEXO I

En este **Anexo I** se describe el trabajo desarrollado por la autora en las estancias realizadas en otros centros de investigación durante la realización de esta Tesis.

Durante la estancia en el **Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona (IIQAB)** y bajo la dirección del Profesor Josep María Bayona Termens, el trabajo ha consistido en el análisis de muestras de aire recogidas en edificios modernos de Barcelona en los que fueron detectados casos de Lipoatrofia Semicircular, una afección dérmica que afecta principalmente a mujeres (**Anexo I.1**). Además, también se ha investigado, mediante foto-SPME, el comportamiento fotoquímico de tres de los compuestos orgánicos más frecuentemente identificados en las muestras de aire analizadas: la cumarina, el 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) y el 2,6-diisopropilnaftaleno (2,6-DIPN) (**Anexo I.2**).

Por otro lado, el trabajo realizado durante la estancia en la **Facultad de Química de la Universidad Politécnica de Gdańsk (Polonia)**, bajo la dirección del Profesor Waldemar Wardencki, ha consistido en la aplicación de la SPME a la evaluación de los efectos de la luz en la degradación oxidativa del aceite (**Anexo I.3**).

ANEXO I.1. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AIRE *INDOOR* DE EDIFICIOS MODERNOS CON CASOS DETECTADOS DE LIPOATROFIA SEMICIRCULAR

En febrero de 2007, una gran empresa de **Barcelona** notificó un brote de una rara lesión llamada **Lipoatrofia Semicircular** (LS) que afectaba a casi 200 personas de los aproximadamente 1.000 trabajadores de plantilla. En septiembre de ese mismo año se habían notificado más de 600 casos, también en otros centros de trabajo, sobre todo de Barcelona pero también del resto de España [1].

La LS es una afección poco frecuente, cuya manifestación clínica consiste en la aparición de marcas leves (depresiones) semicirculares provocadas por pérdida de tejido adiposo, especialmente en la parte frontal de los muslos [2]. La LS afecta habitualmente a personas (sobre todo a las mujeres) que trabajan en **edificios de oficinas nuevos y modernos**. Hasta el momento, no están claras las causas que inciden en la aparición de esta lesión. La hipótesis más aceptada inicialmente fue la que relacionaba la LS con microtraumatismos repetidos [3]; sin embargo, investigaciones más recientes han vinculado esta afección con los campos electroestáticos, los campos electromagnéticos, la humedad relativa y determinadas condiciones de los equipos de trabajo [4, 5].

Los recientes casos detectados en varios edificios modernos de la ciudad de Barcelona han promovido una línea de investigación científica que permita conocer y determinar las causas de esta afección, así como realizar un estudio de población que establezca el índice de afectación en diversos edificios y entornos. Para la obtención de las conclusiones que permitan establecer dichas causas se ha creado un equipo multidisciplinar que garantice tratar las posibles variables que previsiblemente participan en esta afectación, entre las cuales conviene tener en cuenta la presencia de determinados constituyentes químicos que pudieran influir en la calidad ambiental de los lugares afectados.

Así, una parte del trabajo realizado por la autora durante su estancia en el **Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona (IIQAB)** se ha basado en el análisis de muestras de aire recogidas en edificios modernos de Barcelona en los que fueron detectados casos de LS (muestras *caso*). Estas muestras consisten en cartuchos rellenos con resina XAD-2 y con un filtro para las partículas, por los que se hicieron pasar entre 150 y 300 litros de aire, aproximadamente. Se analizaron además muestras *control* tomadas en lugares en los que no hubo afectados por dicha enfermedad, así como muestras *blanco*, es decir, cartuchos de XAD-2 por los que no se hizo pasar aire de ningún tipo.

Para el análisis de cada muestra recibida, la resina de XAD-2 junto con el filtro correspondiente se introdujeron en una pipeta Pasteur con un poco de lana de vidrio en su estrechamiento inferior. A continuación, la resina se fortificó con la adición de una disolución de surrogados. Después, los analitos se eluyeron con acetato de etilo y cada extracto se concentró a temperatura ambiente bajo una corriente de nitrógeno. Seguidamente, se adicionó un patrón interno al extracto concentrado y, finalmente, se inyectó en el equipo de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS). A través de los espectros de masas correspondientes se procedió a la **identificación tentativa** de los compuestos extraídos de las muestras de aire analizadas. Se prestó especial atención a aquellos compuestos que se encontraron a concentraciones significativamente más altas que en los *blancos* analizados. Además, se compararon estadísticamente los niveles obtenidos para estos compuestos segregando las muestras *caso* y *control*.

Los datos y conclusiones extraídos del análisis de estas muestras, así como de muchas otras analizadas por otros miembros del IIQAB una vez finalizada la estancia de la autora en dicho centro, se han incluido en un trabajo actualmente **en preparación** y que se prevé publicar en la revista *Indoor Air* bajo el título "SCREENING OF VOLATILE AND SEMIVOLATILE ORGANIC CONTAMINANTS IN INDOOR AIR COLLECTED IN 63 SPANISH OFFICES".

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pañella, H.; Juanola, E.; de Peray, J.L.; Artazcoz, L. Lipoatrofia Semicircular: un nuevo trastorno de salud relacionado con el trabajo. *Gac. Sanit.* **2008**, 22, 73-75.
- [2] Nagore, E.; Sánchez-Motilla, J.M.; Rodríguez-Serna, M.; Vilate, J.J.; Aliaga, A. Lipoatrophia semicircularis—a traumatic panniculitis: Report of seven cases and review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1998**, 39, 879-881.
- [3] Senecal, S.; Victor, V.; Choudal, D.; Hornez-Davin, S.; Conso, F. Semicircular lipoatrophy: 18 cases in the same company. *Contact Dermatitis* **2000**, 42, 101-120.
- [4] Maes, A.; Curvers, B.; Verschaeve, L. Lipoatrophia semicircularis: an electromagnetic hypothesis. *Electromagn. Biol. Med.* **2003**, 22, 183-193.
- [5] Flagothier, C.; Quatresooz, P.; Pierard, G.-E. Lipolyse électromagnétique et lipoatrophie semi-circulaire des cuisses. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2006**, 133, 577-580.

ANEXO I.2. FOTO-SPME DE CONTAMINANTES *INDOOR*

Desde el punto de vista químico, el **aire de interior** (*indoor*) se comporta como un vaso de reacción en el que continuamente entran y salen compuestos químicos. Algunos de estos compuestos (contaminantes primarios) pueden reaccionar con otros o entre sí, dando lugar a productos derivados (contaminantes secundarios). En estas reacciones de transformación es posible que la **luz** juegue un papel importante y es que, a pesar de que los **procesos fotoquímicos** son más importantes en el exterior que en el interior de los edificios, determinadas especies también se pueden fotodegradar por acción de la iluminación de interior (p.ej. lámparas fluorescentes).

En este trabajo se ha aplicado la **foto-SPME** al estudio del comportamiento fotoquímico de tres de las especies detectadas en las muestras de aire analizadas en los estudios de *screening* mencionados en el Anexo I.1. Concretamente, se ha investigado la fotodegradación de la **cumarina**, el (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol) **BHT** y el 2,6-diisopropilnaftaleno (**2,6-DIPN**). Estas especies se han considerado especialmente interesantes dada la ausencia en la bibliografía de trabajos previos acerca de las rutas de su fotodegradación.

Los resultados obtenidos en este estudio así como la discusión de los mismos se han incluido en el artículo "PHOTO-SOLID PHASE MICROEXTRACTION OF SELECTED INDOOR AIR POLLUTANTS FROM OFFICE BUILDINGS. IDENTIFICATION OF THEIR PHOTOLYSIS INTERMEDIATES" que ha sido **enviado** a la revista *Journal of Chromatography A* y que, por lo tanto, está pendiente de publicación. Dicho trabajo se adjunta a continuación.

PHOTO-SOLID PHASE MICROEXTRACTION OF SELECTED INDOOR AIR POLLUTANTS FROM OFFICE BUILDINGS. IDENTIFICATION OF THEIR PHOTOLYSIS INTERMEDIATES

Maria Fernandez-Alvarez^a, Marta Lores^a, Eric Jover^b, Carmen Garcia-Jares^a,
Josep M. Bayona^c, Maria Llompart^a

^a*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentarios, Universidad de Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela 15782, Spain*

^b*Department of Applied Physics and Optics, University of Barcelona, Av. Diagonal 647,
E-08028 Barcelona, Spain*

^c*Environmental Chemistry Department, IDAEA-CSIC, Jordi Girona, 18, E-08034
Barcelona, Spain*

Abstract

Photo-solid phase microextraction (photo-SPME) has been employed to study the photolysis of three common indoor air pollutants: coumarin, butylated hydroxytoluene, 2,6-diisopropyl-naphthalene. Analytes were first extracted by SPME, and the fibre was subsequently exposed to an irradiation source (i.e. Xenon arc or low pressure mercury lamp) for the selected time (from 2 to 120 min). Analyses of the irradiated fibers were carried out by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) detection. Photodecay kinetics exhibited a first-order behaviour and their rate constants and half-life times estimated. Twenty-five photoproducts have been tentatively identified by means of their mass spectra. On the basis of the identified degradation compounds, some photodegradation pathways were proposed. The photoformation-photodecay kinetics of the identified by-products was also monitored by photo-SPME. To the best of our knowledge, photolytic routes for coumarin, butylated hydroxytoluene and 2,6-diisopropyl-naphthalene have not been previously investigated. Therefore, all the identified photoproducts have been proposed for the first time.

Keywords: Coumarin; Butylated hydroxytoluene; 2,6-Diisopropyl-naphthalene; Photodegradation; Photo-SPME; Solid-phase microextraction; Indoor Air

1. Introduction

In the last years, and especially in the developed countries, the awareness and social demand for indoor air quality (IAQ) have notoriously increased. This demand has emerged as a topic of major concern in office buildings. As with homes, the most important factor influencing indoor air quality in the working place is the presence of pollutant sources. Commonly found office pollutants and their sources include asbestos from insulating and fire-retardant building supplies; formaldehyde from pressed wood products; other organics from building materials, carpets, and other office furnishings, cleaning products, air fresheners, paints, adhesives, copying machines; biological contaminants from dirty ventilation systems or water-damaged walls, ceilings, and carpets; and pesticides from pest management practices [1].

From a chemical perspective, the indoor environment behaves as a reactor vessel with continuously entering and exiting chemicals. Some of these chemicals or primary pollutants can react with others (or themselves) creating reaction byproducts or secondary pollutants that might otherwise be absent from the indoor setting. One of the possible transformation pathways is the photochemical processes. Although outdoor photolysis is more important than indoors, certain species may photolyze under indoor illumination (especially fluorescent lamps) [2]. Most of the works related with indoor photochemistry deal with ultraviolet (UV) air purifiers, devices which take advantage of UV light ability to induce destructive chemical reactions in order to clean the air from harmful organic pollutants. In these studies, kinetics of photocatalytic oxidations and efficiency of catalyst systems are the main subjects [3]. Nevertheless, the identification and study of the possible generated photoproducts are not undertaken. Screening analysis of a large number of indoor air and dust samples enabled the detection a large variety of volatile and semivolatile compounds [4, 5]. The photochemical fate of three of them, namely coumarin, butylated hydroxytoluene and 2,6-diisopropylnaphthalene, has been considered of special interest due to the scarcity of publications about their photochemistry [6-8]. Indeed, coumarin is a fragrance ingredient, with a characteristic odour like that of vanilla beans, widely used as an additive in perfumes and fragranced consumer products at concentrations ranging from 0.5 to 6.4% in fine fragrances and at less than 0.01% in detergents [9]. Butylated hydroxytoluene (BHT) has been widely used for many years as antioxidant

to preserve and stabilize the freshness, nutritive value, flavour and colour of fat-containing foods, edible fats, oils and animal feed products. BHT can also improve the stability of pharmaceuticals, fat-soluble vitamins and cosmetics. Moreover, the service life of rubber, elastomers and plastics is also increased by the addition of BHT. Thus, there is widespread human exposure to this compound [10, 11]. Finally, 2,6-diisopropylnaphthalene (2,6-DIPN), along with other uses such as plant growth regulator to suppress sprouting of stored potatoes [12], is employed as solvent for carbonless copy paper and thermal paper manufacture [13].

Photo-SPME is a useful technique in elucidating the photodegradation mechanisms of a variety of environmental pollutants. Using photo-SPME, the irradiation of the analytes takes place after the extraction, that is, when the fibre is already loaded with the analytes. In this way, the simultaneous analysis of both parent compounds and photoproducts is possible [14]. This procedure has been successfully applied to the study of the photochemical behaviour of several groups of compounds such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) [15], musks [16], or polychlorinated biphenyls (PCBs) [17], among others.

In this paper, the photochemical fate of three model compounds of indoor air pollution namely, coumarin, BHT, 2,6-DIPN, was investigated, employing SPME fibres as photoreaction support and gas chromatography-mass spectrometry as separation and detection technique. Two different light sources were employed in the irradiation experiments: xenon arc and low-pressure mercury lamps. The analyte photodecay kinetics was studied, the photoproducts generated were tentatively identified, and photodegradation pathways proposed. Some of the photoproducts have demonstrated to be more light persistent and more toxic than the parent compounds.

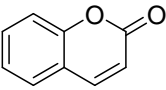
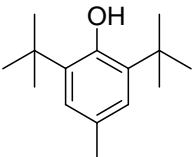
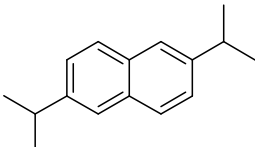
2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 1-benzopyran-2-one (coumarin) were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). 2,6-Diisopropylnaphthalene (2,6-DIPN) was acquired from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Chemical structures,

retention times and quantification and identification ions selected for these compounds are depicted in Table 1. Ethyl acetate (HPLC grade) was acquired from Prolabo (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Methanol (gradient grade) and n-hexane (GC grade) were obtained from Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain).

Table 1. Chemical structures, retention times and quantification ions of the target compounds.

Compound	Chemical structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions
Coumarin		8.06	118+146	146, 118, 90, 63
BHT		8.44	205	205, 220, 177, 145
2,6-DIPN		10.28	197	197, 212, 155, 141

Individual stock solutions of 4900-5100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared in methanol. By dilution of stock solutions, working solutions of 1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared in the same solvent and used for photo-SPME experiments. Solutions of the target compounds in hexane were also employed in order to study the possible influence of methanol in the photodegradation routes and in the chemical nature of the photoproducts obtained from BHT and 2,6-DIPN. For daily evaluation of the GC equipment, solutions of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in ethyl acetate were prepared.

2.2. Solid-phase microextraction and photodegradation procedures

In the previous photo-SPME studies of organic compounds, SPME extractions of the analytes were performed from water samples containing such compounds [14-17]. In the present work we tried to simulate, as far as possible, the sampling of air contaminated with the target compounds. With this aim, the following SPME procedure

is proposed: 20 μL of a solution of the target compounds in methanol ($1\text{--}100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) were placed in a 40 mL vial, and heated for 5 min at the extraction temperature of $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. The SPME fibre (100 μm , polydimethylsiloxane, PDMS, Supelco – Bellefonte, PA, USA) was then exposed to the headspace, and HSSPME carried out for 30 min. The fibre was thermally desorbed in the GC injection port at $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min.

On the one hand, a Suntest CPS (Atlas Material Testing Solutions, Chicago, IL, USA) solar simulator equipped with a xenon arc lamp 1500 W (NXe 1500B, Atlas) as the radiation source was used for photolysis experiments. The lamp was set to medium intensity (550 W/m^2), the correspondent light dose for 1 h of irradiation was 1980 kJ/m^2 . The internal temperature of the photosimulator was maintained at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. The fibre was protected in a quartz vial, due to the powerful fans placed inside the chamber of the simulator, and submitted to the Xe lamp irradiation for the required time. Irradiation experiments were also conducted in a laboratory made photoreactor equipped with two low-pressure mercury lamps (8-10 W, 254 nm). In this device, the fibre, after the SPME procedure, was manually placed and clamped inside the photoreactor box.

In the control experiment (0 min of irradiation), after extraction, the fibre was inserted directly into the injection port of the gas chromatograph, and GC-MS analysis performed. In the “on-fibre” photodegradation experiments, after SPME extraction, the SPME fibre with the analytes already absorbed was subjected to light irradiation into the corresponding photoreactor for the selected time (2-120 min); subsequently, GC-MS analyses were carried out.

Dark test was carried out by pulling back the fibre, with the pre-absorbed analytes, in the SPME holder during exposition to radiation for 60 min in the photoreactor. The fibre was then desorbed in the chromatographic system and GC analysis performed.

2.3. GC-MS determination

Analyses were performed in two different equipments. A Trace GC 2000 system (Thermo Finnigan, Austin, TX, USA), equipped with a Merlin Microseal Septum System injector and coupled to a Thermo Finnigan quadrupole Trace mass spectrometer was

used in the Suntest irradiation experiments. This GC-MS system was run by Xcalibur 2.1 version software. A Varian 450 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a 1079 split/splitless injector and an ion trap mass spectrometer Varian 240 (Varian Chromatography Systems) was used in the ultraviolet (254 nm) irradiation experiments. Compounds were separated on a 30 m x 0.25 mm i.d. HP-5MS column coated with a 0.25 μ m film. The GC oven temperature program was: 70 °C (hold 1 min), rate 15 °C min⁻¹ to 200 °C, rate 10 °C min⁻¹ to 250 °C, rate 5 °C min⁻¹ to 290 °C (hold 5 min), with a total acquisition program of 27.67 min. Helium was employed as carrier and damping gas, with a constant flow rate of 1.2 and 2.5 mL min⁻¹, respectively. The injector was programmed to return to the split mode 2 min after the beginning of a run. Injector, trap, manifold, transfer line and ion source temperatures were 280 °C, 150 °C, 40 °C, 290 °C and 200 °C, respectively. The ion-trap mass spectrometer was operated in the electron-impact mode at 70 eV. A range of m/z 40-450 was scanned at a scan rate of 0.7 scans/s. The multiplier was set at a nominal value of 1750 V. This GC-MS system was controlled by Saturn workstation v 6.9.1 software.

3. Results and discussion

Screening analyses of indoor air samples collected in office buildings were performed in order to investigate the possibility of air contamination in such places. Among other compounds, coumarin, BHT and 2,6-DIPN were detected in a high frequency of detection in the indoor gas phase samples [4]. Due to the scarcity of reported photochemical data of these compounds, their photodegradation study was considered to be an interesting topic and, with this purpose, advantages of photo-SPME in this field [14] were exploited.

As it was previously emphasized [14], in on-fibre photodegradation, optimization of the SPME conditions is not crucial; nevertheless, it is obviously important to demonstrate the repeatability of the extraction method. Thus, under the conditions specified in the Experimental Part, method precision was evaluated ($n=5$) in terms of relative standard deviations (RSD) and satisfactory results (RSD < 8%) were obtained for the target compounds.

3.1. Photo-SPME

Following the usual procedure in the photo-SPME technique [14-17], preliminary experiments to test the feasibility of the photochemical studies were carried out. Once the photodegradation of the three compounds tested was proved, a dark test was performed (see Experimental Part) in order to demonstrate if the decrease in analytical responses after irradiation of the PDMS fibre was only due to the action of photons. The obtained results (see Fig. 1) indicated that the decrease of signal only took place in the irradiation experiments, confirming that no analyte losses through other processes such as volatilization occurred.

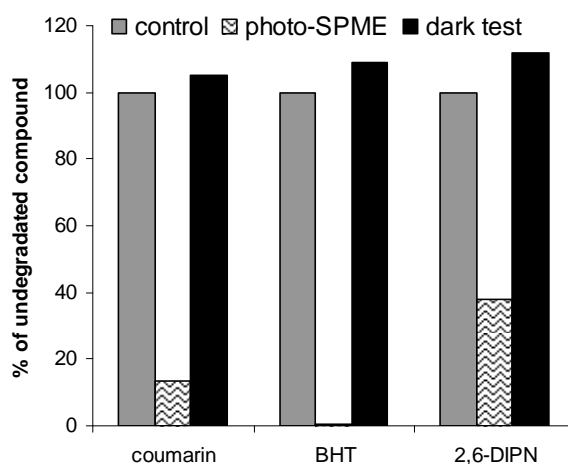
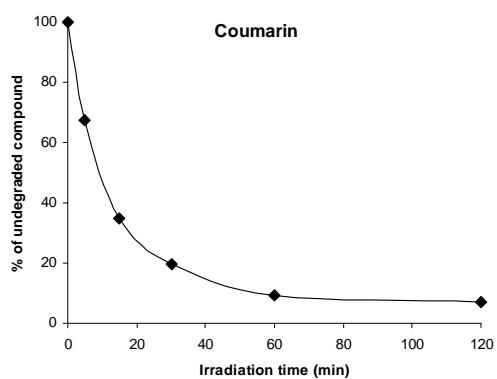
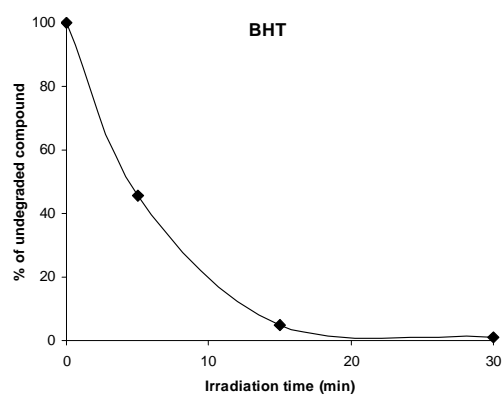


Figure 1. Obtained results for the dark test and photo-SPME (Xe arc lamp, 60 min) for the target analytes compared with the control (no irradiated) experiment.

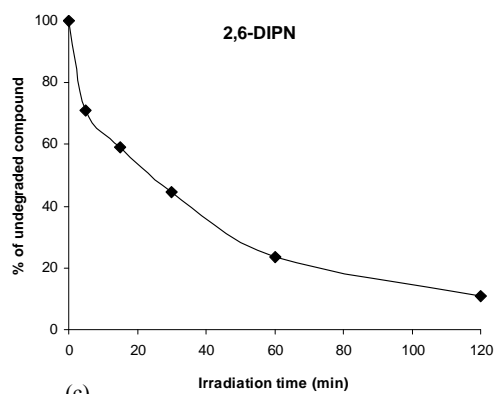
The photodegradation kinetics of the target compounds was monitored by studying the influence of the irradiation time on their analytical response. After the extraction of the analytes, the PDMS fibre was exposed to light for different periods of time (0-120 min); subsequently, GC-MS analyses were accomplished. Fig. 2 illustrates the results obtained (percentage of undegraded compound vs. irradiation time) for each compound in the Suntest (Xe lamp) experiments. As can be seen in Fig. 2a, after 60 min, less than 10% of coumarin remained in the fibre. BHT was nearly completely degraded (<2%) after 30 min of irradiation (Fig. 2b), while to degrade around 90% of the initial amount of 2,6-DIPN, 120 min of irradiation are needed (Fig. 2c).



(a)



(b)



(c)

Figure 2. Kinetics of photodegradation obtained in Photo-SPME experiments with low-pressure mercury lamps (254 nm) and with Xe arc lamp (Suntest) for: (a) coumarin; (b) BHT; (c) 2,6-DIPN.

By plotting the neperian logarithm of the percentage of undegraded compound against irradiation time, first-order kinetic behaviour was demonstrated for all photodegradation reactions. Correlation coefficients of the least-squares regressions (R), together with apparent first-order rate constants (k_{ap}) and half-life times ($t_{1/2}$) calculated from the slopes of the corresponding straight-line equations have been included in Table 2.

Table 2. Kinetic parameters for the compounds under study (Xe arc lamp experiments).

<i>Compound</i>	<i>R</i>	<i>k_{ap}</i> (<i>min</i> ⁻¹)	<i>t_{1/2}</i> (<i>min</i>)
Coumarin	0.9741	0.0534	13
BHT	0.9966	0.208	3.3
2,6-DIPN	0.9860	0.0177	39

The same experiments were repeated with UV light (254 nm, 18 W) producing equivalent results. BHT photodegradation was performed at 8 W originating a kinetic curve with a linear drop of the signal (after 5 min of irradiation) characterized by a slower photodegradation rate. Anyway, as in Suntest experiments, BHT was practically degraded (<2%) after 30 min of UV exposure.

3.2 Identification of photoproducts

A great number of photoproducts were detected in these experiments and some of them were tentatively identified on the basis of their mass spectra and the NIST Mass Spectral Database (NIST 08, Software Version 2.0f, 2008). Irradiation with both light sources (Hg and Xe lamps) led to the same by-products. Individual studies have revealed the origin of each particular photoproduct. Coumarin, BHT and 2,6-DIPN photoproducts were named with letters C, B and D, respectively; their corresponding structures, retention times and identification and quantification ions are shown in Tables 3-5. The last column of these tables also summarizes the identification approach followed for each photoproduct. In some cases, the corresponding theoretical mass spectra were not found in the NIST Spectral Database, and identification was based on experimental mass spectra elucidation (*B* 1, *D* 6-7, *D* 9-10) or on the similarities between the experimental mass spectra and the theoretical ones of certain isomers (*D* 1-5, *D* 8). Some of the proposed photoproducts (*B* 1, *B* 2, *B* 4, *B* 8, *D* 3, *D* 10-11) led to the assumption that the addition of hydroxyl groups was one of the

photolytic routes for BHT and 2,6-DIPN. As mentioned in the Experimental Part, the spike of the target compounds to the SPME vial was performed by addition of a microdrop (20 μ L) of a methanol solution containing the analytes. Methanol was discarded as the source of those hydroxyl groups after having performed analogue experiments using hexane obtaining the same hydroxylated photoproducts.

It is important to highlight that no previous studies concerning photodegradation pathways of coumarin, BHT and 2,6-DIPN could be found in the literature; thus, to the best of our knowledge, all these photoproducts are reported for the first time. Once these by-products were identified, it was also imperative to evaluate their photochemical persistence (by registering their corresponding photoformation-photodegradation kinetic curves) and to consider their potential toxicity (by deeming the published toxicity studies related to their possible adverse effects).

Table 3. Identified photoproducts generated in the photo-SPME of coumarin.

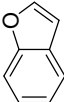
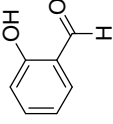

Key	Photoproduct	Structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions	Identification based on
C 1	2,3-benzofuran		3.81	118	118, 89, 90, 63	-theoretical mass spectrum
C 2	2-hydroxybenzaldehyde		4.28	121+122	121, 122, 65, 93	-theoretical mass spectrum -retention time of an authentic standard
C 3	2,3-dihydrobenzofuran		5.24	91+120	91, 120, 119, 63	-theoretical mass spectrum

Table 4. Identified photoproducts generated in the photo-SPME of BHT.

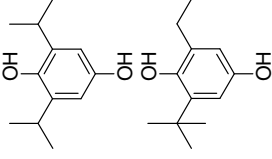
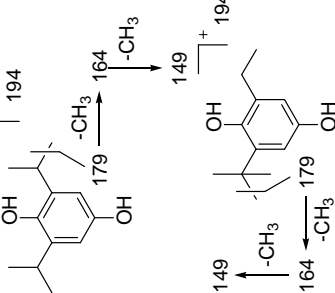
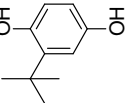
Key	Photoproduct	Structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions	Identification based on
B 1	2,6-diisopropylbenzene-1,4-diol or 2-tert-butyl-6-ethylbenzene-1,4-diol		4.69	179	179, 164, 194, 149	-experimental ion justification: 
B 2	2-tert-butylbenzene-1,4-diol		6.75	123+151	151, 123, 166, 77	-theoretical mass spectrum

Table 4. Identified photoproducts generated in the photo-SPME of BHT, (cont.).

Key	Photoproduct	Structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions	Identification based on
B 3	1,3-di-tert-butyl-5-methylbenzene		6.80	189	189, 204, 57, 41	-theoretical mass spectrum
B 4	2,6-di-tert-butylbenzene-1,4-diol		6.89	207+222	207, 222, 192, 177	-theoretical mass spectrum
B 5	2-tert-butyl-6-methylphenol		7.10	149	149, 121, 164, 91	-theoretical mass spectrum
B 6	2-tert-butyl-4-methylphenol		7.21	149	149, 121, 164, 91	-theoretical mass spectrum
B 7	2-tert-butyl-4,6-dimethylphenol		7.42	163+178	163, 135, 178, 91	-theoretical mass spectrum
B 8	2,6-di-tert-butyl-4-(hydroxymethyl)phenol		7.74	221+236	221, 236, 193, 205	-theoretical mass spectrum

Table 4. Identified photoproducts generated in the photo-SPME of BHT, (cont.).

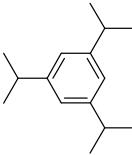
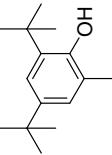
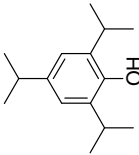
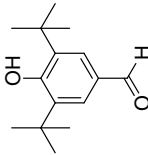
Key	Photoproduct	Structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions	Identification based on
B 9	1,3,5-triisopropylbenzene		7.83	189+204	189, 204, 161, 133	-theoretical mass spectrum
	isomers of BHT:					
	2,4-di-tert-butyl-6-methylphenol					
B 10	2,4,6-triisopropylphenol		8.88 9.06	205+220	205, 220, 177, 189	-theoretical mass spectrum
B 11	3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde		10.50	219	219, 234, 191, 175	-theoretical mass spectrum

Table 5. Identified photoproducts generated in the photo-SPME of 2,6-DIPN.

Key	Photoproduct	Structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions	Identification based on
D 1	2,6-dimethylnaphthalene		7.57	141+156	156, 141, 76	-theoretical mass spectrum of the isomer 1,2-dimethylnaphthalene
D 2	2-ethyl-6-methylnaphthalene		8.14	155+170	155, 170, 128, 115	-theoretical mass spectrum of 2-isopropylnaphthalene
D 3	(2-methylnaphthalen-6-yl)methanol		8.27	157+172	157, 172, 128, 129	-theoretical mass spectrum of the isomer 5,7-dimethylnaphthalen-1-ol
D 4	2,6-diethylnaphthalene		9.04	169+184	169, 184, 154, 141	-theoretical mass spectrum of the isomer 7-isopropyl-1-methylnaphthalene
D 5	2-ethyl-6-isopropylnaphthalene		9.81	183+198	183, 198, 153, 155	-theoretical mass spectrum of the isomer 4-isopropyl-1,6-dimethylnaphthalene
						-similarities between the experimental mass spectrum and the theoretical mass spectrum of 2,6-DIPN
						-experimental ion justification:
D 6	2-isopropyl-6-(prop-1-en-2-yl)naphthalene		10.85	195+210	195, 210, 167, 180	

Table 5. Identified photoproducts generated in the photo-SPME of 2,6-DIPN, (cont.).

Key	Photoproduct	Structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions	Identification based on
D 7	2,6-di(prop-1-en-2-yl)naphthalene		11.41	208	208, 193, 178, 167, 152	-experimental ion justification:
D 8	2-tert-butyl-6-ethylnaphthalene		11.73	197	197, 212, 169, 155	-theoretical mass spectrum of 2,6-diisopropyl-naphthalene
D 9	2-tert-butyl-6-isopropynaphthalene		11.89	197+155	197, 155, 226, 211	-similarities between the experimental mass spectrum and the theoretical mass spectrum of 2,6-DIPN -experimental ion justification:

Table 5. Identified photoproducts generated in the photo-SPME of 2,6-DIPN, (cont.).

Key	Photoproduct	Structure	Retention time (min)	Quantification ions	Identification ions	Identification based on
D 10	2-(2-isopropyl)naphthalen-6-yl)propan-2-ol		12.25	213	213, 228, 171, 195	-similarities between the experimental mass spectra of this photoproduct and 2,6-bis(2-hydroxy-2-propyl)naphthalene (D 11) -experimental ion justification:
D 11	2,6-bis(2-hydroxy-2-propyl)naphthalene		13.20	229	229, 169, 244, 141	-theoretical mass spectrum

3.2.1 Photoproducts of Coumarin

Three compounds (C 1-3, see Table 3) have been tentatively proposed as coumarin photoproducts. The proposed photodegradation routes for this analyte are illustrated in Fig. 3.

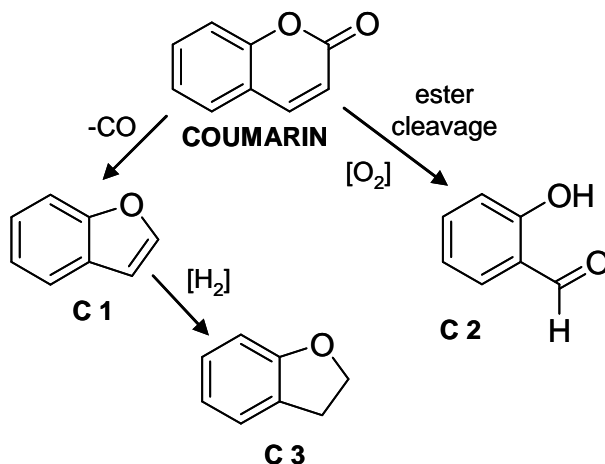


Figure 3. Proposed photodegradation pathways for coumarin.

Photoproduct C 1, tentatively identified as 2,3-benzofuran, could be originated by CO cleavage of coumarin. This compound might be cause for concern since, on the basis of inadequate evidence for carcinogenicity in humans and sufficient evidence for carcinogenicity in experimental animals, it was classified by IARC (International Agency for Research on Cancer) as possibly carcinogenic to humans (group 2B) [18]. C 2 (2-hydroxybenzaldehyde) might be generated from coumarin, by ester bond cleavage and oxidation of the carbon-carbon double bond conjugated with the aromatic ring. C 2 was identified on the basis of, not only the NIST mass spectrum, but also by comparison with the elution time and the mass spectrum of an authentic standard of this compound. Photoproduct C 3 was identified as 2,3-dihydrobenzofuran, probably formed by reduction of C 1. Photoproducts are susceptible to further photodegradation, as can be easily deduced from Fig. 4a that shows the ion chromatograms obtained for 0, 5, 15, 30 and 120 min of irradiation, illustrating the formation and degradation of C 3 and its experimental and theoretical mass spectra. By registering the changes in peak areas with the irradiation time, C 1-C 3 photoformation-photodecay curves were obtained (Fig. 6a); in the three cases, after

reaching their maximum concentration (between 15 and 30 min of irradiation), their degradation is appreciated. It must be taken into account that one photoproduct might be simultaneously being generated and photodegraded. Nevertheless, more than 90% of coumarin was degraded in 60 min and besides it scarcely photodegrades from 60 to 120 min of irradiation (Fig. 2a), so we can speculate that *C 1* and *C 3* are hardly being generated in such time interval. Then, considering that more than 50% of their maximum concentration remained undegraded after 120 min of irradiation, it can be stated that 2,3-benzofuran (*C 1*) and 2-hydroxybenzaldehyde (*C 2*) are quite persistent under the investigated conditions. The fact that 2,3-benzofuran (*C 1*) is considered as a persistent pollutant and a potential carcinogen should not be forgotten. Regarding 2,3-dihydrobenzofuran (*C 3*), its photodegradation is clearly faster.

3.2.2 Photoproducts of BHT

Eleven compounds were proposed as BHT by-products (*B 1-11*, see Table 4). Photoproduct *B 1* was tentatively identified on the basis of its mass spectrum interpretation. There are two possibilities: it could be either 2,6-diisopropylbenzene-1,4-diol or 2-*tert*-butyl-6-ethylbenzene-1,4-diol. In both cases, the fragmentation pattern, m/z 194, m/z 179, m/z 164 and m/z 149, is consistent with $[M]^+$, $[M-CH_3]^+$, $[m/z\ 179-CH_3]^+$ and $[m/z\ 164-CH_3]^+$. The remaining photoproducts (*B 2-11*) were tentatively identified on the basis of the corresponding theoretical mass spectra. Fig. 4b reflects the ion chromatograms obtained for 0, 2, 5, 15 and 30 min of irradiation for photoproducts *B 5* and *B 6*, as well as their corresponding mass spectra. As can be deduced from this Figure, *B 5* was already detected in the unexposed fibre, which indicates its presence as impurity in the BHT solution. Nevertheless, it can be considered as photoproduct since an increase in its peak area with the irradiation time was clearly appreciated. Among all the photoproducts found, some could be toxic, although there is no much information available regarding this toxicity, with the exception of the *B 2* (*tert*-butylhydroquinone, tBHQ); even though *B 2* has beneficial effects as a food antioxidant, a number of studies have shown that chronic exposure to this compound may induce carcinogenicity [19].

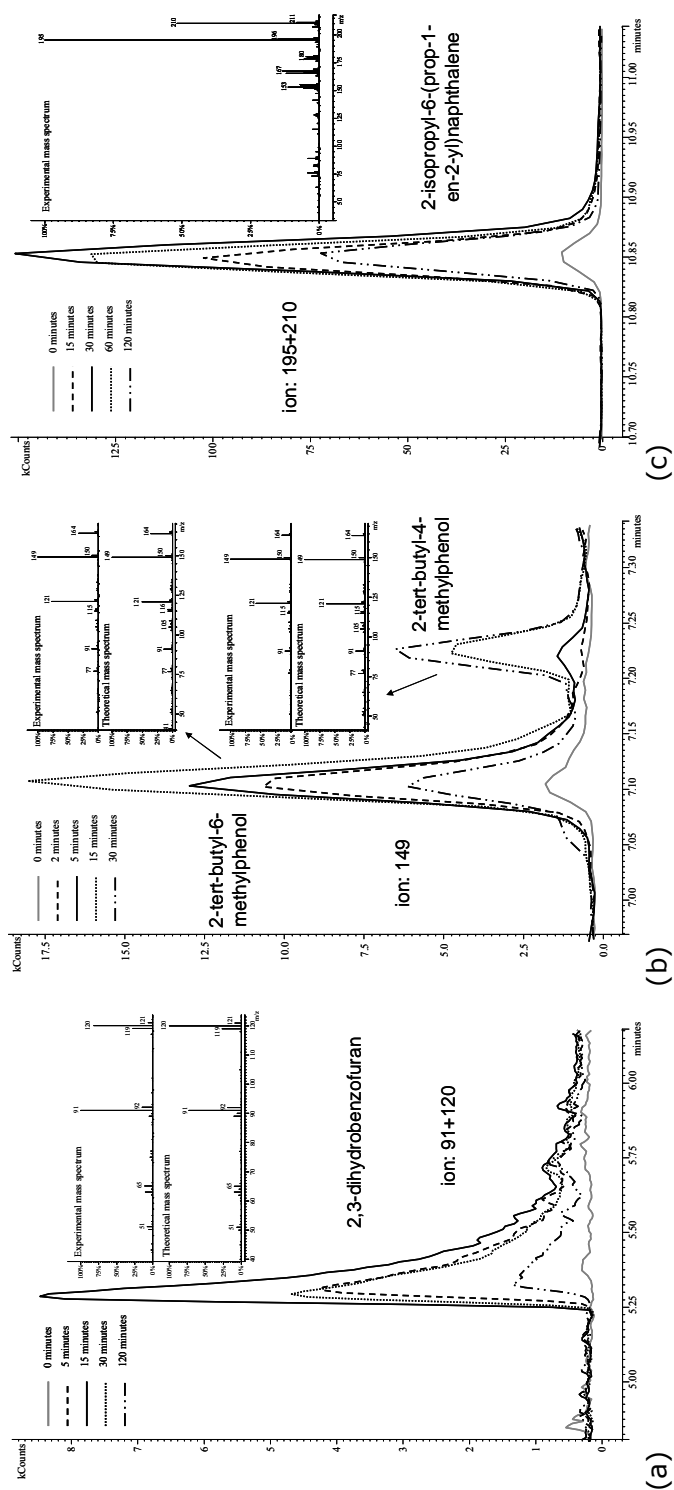


Figure 4. Mass spectra and ion chromatograms showing the Photo-SPME formation and decay of photoproducts: (a) 2,3-dihydrobenzofuran (B 3); (b) 2-tert-butyl-6-methylphenol (B 5) and 2-tert-butyl-4-methylphenol (B 6); (c) 2-isopropyl-6-(prop-1-en-2-yl)naphthalene (D 6).

In this case, it is complex to propose detailed photodegradation pathways for BHT due to the great number of possibilities to explain the generation of the identified photoproducts by means of radical mechanisms and the difficult to account these routes only on the basis of intermediate radicals stability. Nevertheless, the general photodegradation mechanisms can be deduced and are proposed in Fig. 5: loss of alkylic groups, loss or addition of hydroxyl groups, isomerizations and oxidations are the most logical photoreactions. For example, it seems reasonable to think that photoproduct *B 11* arose from oxidation of *B 8*; although they must be interpreted with caution, the formation-photodegradation curves of these photoproducts (see Fig. 6b) could support the previous affirmation, since the belated generation of *B 11* (compared to *B 8*) might be attributed to its character of secondary photoproduct.

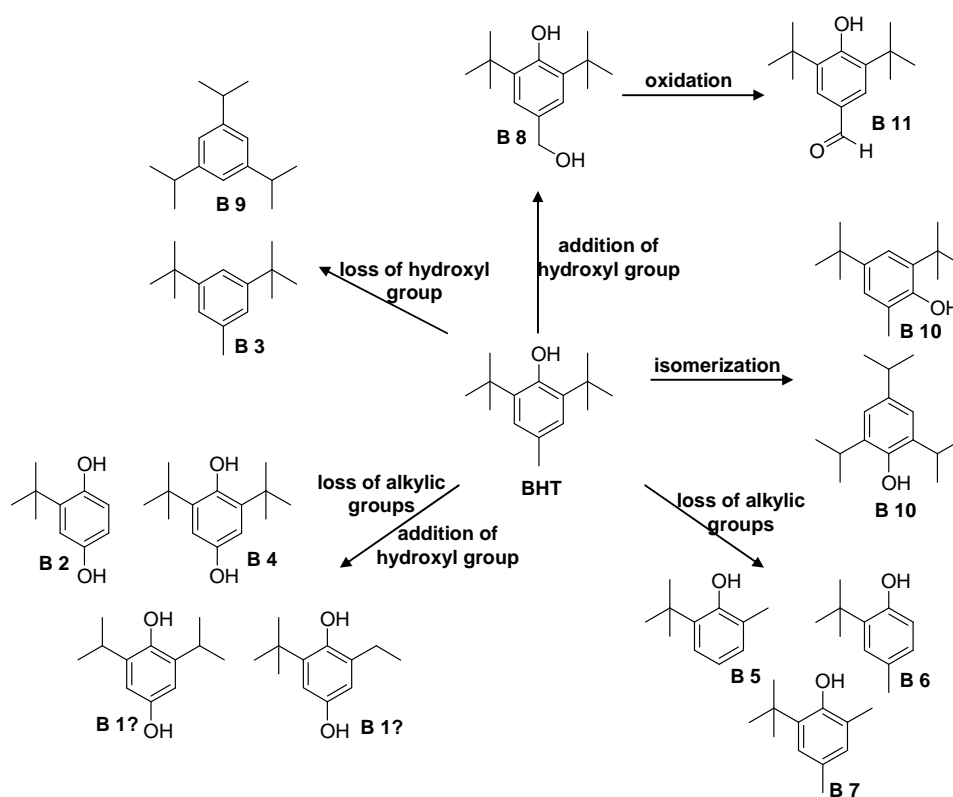


Figure 5. General photodegradation mechanisms proposed for BHT.

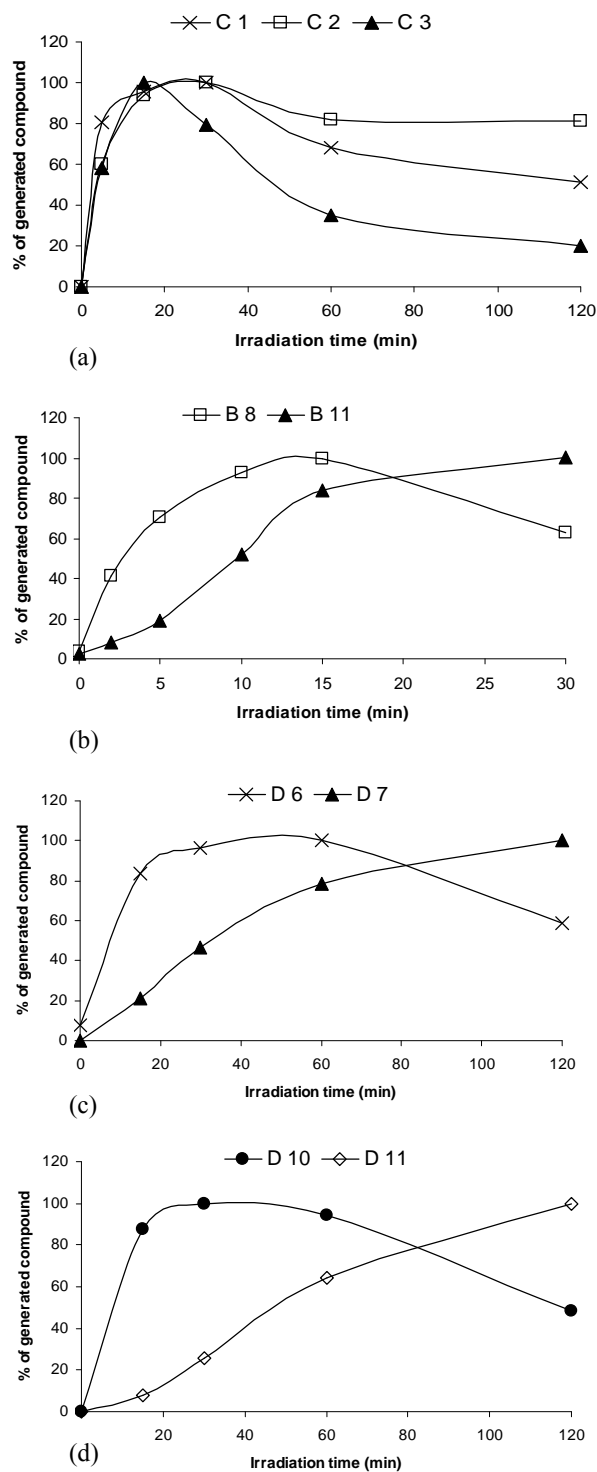


Figure 6. Photoformation-photodegradation kinetic curves of photoproducts (a) C 1, C 2 and C 3; (b) B 8 and B 11; (c) D 6 and D 7; (d) D 10 and D 11.

3.2.3 Photoproducts of 2,6-DIPN

Eleven compounds (*D 1-D 11*, see Table 5) were tentatively identified as photoproducts of 2,6-DIPN and proposed photodegradation pathways are shown in Fig. 7. The relative stability of the suggested intermediate radicals (denoted with prefix R in Fig. 7) was keynote all through the identification process, especially in the case of photoproducts *D 1*, *D 4*, *D 9* and *D 10*. That is, the following commonly accepted stability order was taken into account: benzyl radical \sim tertiary radical $>$ secondary radical $>$ primary radical $>$ aryl radical [20].

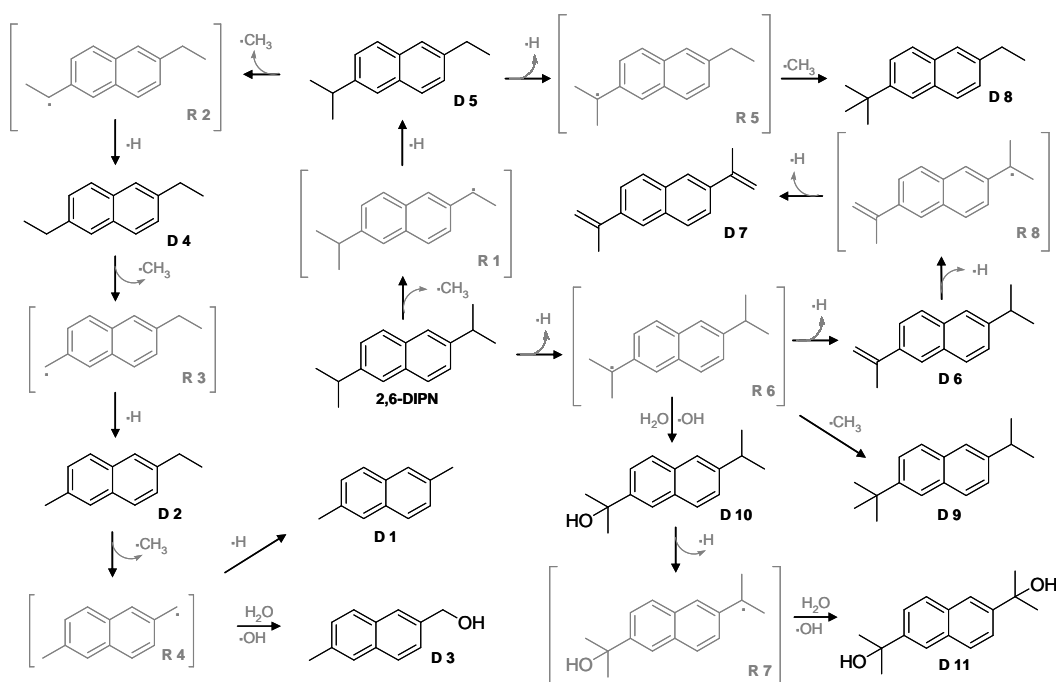


Figure 7. Proposed photodegradation pathways for 2,6-DIPN.

Photoproducts arising from the consecutive cleavages of methyl groups of 2,6-DIPN were detected. Loss of the first methyl group can lead only to one compound, 2-ethyl-6-isopropyl-1-naphthalene (*D 5*), which might be generated through radical *R 1*. Loss of the second methyl group could yield two different chemical structures: 2,6-diethylnaphthalene or 2-isopropyl-6-methylnaphthalene. Nevertheless, the former is more probable than the latter because radical *R 2* (secondary benzylic) is more stable

than the primary benzylic radical precursor of 2-isopropyl-6-methylnaphthalene. 2,6-diethylnaphthalene (*D* 4) may lose a methyl group (through radical *R* 3) leading to photoproduct *D* 2 (2-ethyl-6-methylnaphthalene). In turn, *D* 2 might undergo a new loss of a methyl group to generate photoproduct *D* 1. Loss of a methyl group in benzylic position (radical *R* 4) is more probable than in aryl position, thus, *D* 1 is assumed to be 2,6-dimethylnaphthalene (instead of 2-ethylnaphthalene). Besides, radical *R* 4 may react with water present in the ambient or abstract an hydroxyl radical from a neighbouring molecule, yielding photoproduct *D* 3 ((2-methylnaphthalen-6-yl)methanol).

On the other hand, it is also probable that *D* 5 loses a tertiary benzylic hydrogen atom forming radical *R* 5 which, in turn, may abstract a methyl group from another molecule leading to a 2,6-DIPN isomer: 2-tert-butyl-6-ethylnaphthalene (*D* 8).

Radical *R* 6 (tertiary benzylic) is expected to be generated if 2,6-DIPN loses a hydrogen atom. *R* 6 can abstract a methyl group yielding 2-tert-butyl-6-isopropylnaphthalene (*D* 9) which was tentatively identified on the basis of the fragmentation pattern m/z 226, m/z 211 and m/z 197, consistent with $[M]^+$, $[M-CH_3]^+$ and $[m/z\ 211-CH_3+H]^+$. *R* 6 may abstract a hydroxyl group or react with water yielding photoproduct *D* 10 (2-(2-isopropylnaphthalen-6-yl)propan-2-ol), which elucidation was also performed on the basis of experimental ion justification (m/z 228 $[M]^+$, m/z 213 $[M-CH_3]^+$, m/z 195 $[m/z\ 213-H_2O]^+$, m/z 171 $[m/z\ 213-CH(CH_3)_2+H]^+$). *D* 10 can lose a tertiary benzylic hydrogen atom leading to radical *R* 7 which, in an analogue way to *R* 6, may lead to 2,6-bis(2-hydroxy-2-propyl)naphthalene (*D* 11).

Finally, radical *R* 6 might lose a hydrogen atom to generate the alkene *D* 6 (2-isopropyl-6-(prop-1-en-2-yl)naphthalene)). This route could be favoured because of the formation of a double bond conjugated with the aromatic structure. *D* 6 was tentatively identified according to the fragment ions observed in the electron impact spectrum (m/z 210 $[M]^+$, m/z 195 $[M-CH_3]^+$, m/z 180 $[m/z\ 195-CH_3]^+$, m/z 167 $[m/z\ 180-CH]^+$). The overlapped ion chromatograms of *D* 6 corresponding to 0, 15, 30, 60 and 120 min of irradiation are shown in Fig. 4c. Its experimental mass spectrum is also illustrated. The successive loss of two hydrogen atoms from *D* 6 (through radical *R* 8) may yield *D* 7 (2,6-di(prop-1-en-2-yl)naphthalene), with two double bonds

conjugated with the naphthalene ring. *D* 7 mass spectrum is mainly characterized by the ions m/z 208, m/z 193, m/z 178, m/z 167 and m/z 152 corresponding to the ions $[M]^+$, $[M-CH_3]^+$, $[m/z\ 193-CH_3]^+$, $[M-C(CH_3)=CH_2]^+$ and $[m/z\ 193-C(CH_3)=CH_2]^+$.

The character of primary photoproducts of *D* 6 and *D* 10, and of secondary photoproducts of *D* 7 and *D* 11 can be again sustained by their corresponding kinetics (see Fig. 6c-d).

4. Conclusions

Photo-SPME has been applied to the photochemical study of three compounds, coumarin, BHT, 2,6-DIPN, detected in indoor air samples from office building. The three compounds rapidly degrade by the action of light, employing two different irradiation sources (Hg lamps or Xe arc lamp). The photodecay curves were obtained, and the kinetic parameters were calculated. Twenty-five photoproducts were tentatively identified and their photoformation-photodecay curves were followed by photo-SPME. Photodegradation pathways were also proposed. Some of the photoproducts have demonstrated to be more light persistent and more toxic than the parent compounds. To the best of our knowledge, neither of these by-products have been detected before.

Acknowledgements

Funding was obtained through the LIPOSEARCH project (La Caixa, Mutua Universal, Abertis, Caixa Catalunya, Gas Natural, and Telefónica), and projects CTQ2006-03334 (CICYT, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and PGIDT06PXI3237039PR (Xunta de Galicia). M. F. A would like to acknowledge a FPU doctoral grant to the Ministerio de Ciencia y Tecnología.

References

- [1] An Introduction to Indoor Air Quality (IAQ), Indoor Air Quality, U.S. Environmental Protection Agency (EPA) <http://www.epa.gov/iaq/ia-intro.html>
- [2] C.J.Weschler, H.C. Shields, Atmos. Environ. 31 (1997) 3487.
- [3] S.Wang, H.M. Ang, M.O. Tade, Environ. Int. 33 (2007) 694-705.

- [4] A. Nilsson, V. Lagesson, C.-G. Bornehag, J. Sundell, C. Tagesson, *Environ. Int.* 31 (2005) 1141.
- [5] C. Domínguez, M. Fernández, L. Baltasar, E. Jover, M. Llompарт, J. Codina, J.M. Bayona (in preparation). To be submitted to *Indoor Air*.
- [6] J.M. Lynch, A.M. Zobel, Special Publication-Royal Society of Chemistry, *Drugs: Photochemistry and Photostability, Photostability of coumarin*, 225 (1998) 162.
- [7] N. Mikami, H. Gomi, J. Miyamoto, *Chemosphere* 8 (1979) 311.
- [8] K. Fukuda, Y. Inagaki, T. Maruyama, H.I. Kojima, T. Yoshida, *Chemosphere* 17 (1988) 651.
- [9] Opinion on Coumarin (sensitisation only), Adopted by the Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) during the 8th plenary meeting of 20 June 2006, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General.
- [10] G.M. Williams, M.J. Iatropoulos, J. Whysner, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 1027.
- [11] Butylated Hydroxytoluene (BHT), International Agency for Research on Cancer (IARC)-Summaries and Evaluations, 40 (1996) 161-163.
- [12] 2,6-Diisopropyl-naphthalene, Biopesticide Registration Action Document, U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Office of Pesticide Programs.
- [13] M.M. Boccacci, E. Chiaccherini, C. Gesumundo, *Food Addit. Contam.* 16 (1999) 207-213.
- [14] L. Sánchez-Prado, M. Llompарт, M. Fernandez-Alvarez, M. Lores, C. Garcia-Jares "A novel use of sorbents for photochemical studies: Photo-Solid-Phase Microextraction (Photo-SPME)" in *Sorbents: Properties, Materials and Applications* Ed. T.P. Willis, Nova Publishers, 2009 (in press).
- [15] L. Sánchez-Prado, M. Lores, M. Llompарт, C. Garcia-Jares, J.M. Bayona, R. Cela, J. *Chromatogr. A* 1124 (2006) 157.
- [16] L. Sanchez-Prado, M. Lores, M. Llompарт, C. Garcia-Jares, M. Lourido, R. Cela, J. *Chromatogr. A* 1048 (2004) 73.
- [17] M. Lores, M. Llompарт, R. Gonzalez-Garcia, C. Gonzalez-Barreiro, R. Cela, J. *Chromatogr. A* 963 (2002) 37.
- [18] Benzofuran, International Agency for Research on Cancer (IARC)-Summaries and Evaluations, 63 (1995) 431.
- [19] N. Gharavi, A.O.S. El-Kadi, *Metabolism and Disposition* 33 (2005) 365.
- [20] J. McMurry, *Organic Chemistry*, 5th Ed.; Brooks/Cole. CA, USA, 2000.

ANEXO I.3. ESTUDIO DE LA FOTOOXIDACIÓN DEL ACEITE MEDIANTE SPME

El aceite de oliva es la principal fuente de grasas en la dieta Mediterránea, mientras que el **aceite de colza** con bajo contenido en ácido erúico es el aceite vegetal más popular en los países Escandinavos y de Europa Central. Ambos aceites son ricos en ácido oleico (C18:1 n-9) pero también contienen cantidades considerables de otros **ácidos grasos insaturados**: el ácido linoleico (C18:2 n-6) está presente en ambos aceites, mientras que el ácido linolénico (C18:3 n-3) se encuentra en el aceite de colza en cantidades sustanciales (8-12%). [1]

La exposición de **grasas y aceites** a una atmósfera con oxígeno puede conducir a la **degradación oxidativa** de los mismos. Este proceso implica principalmente la oxidación de los ácidos grasos insaturados (o de sus derivados) generándose peróxidos que, a su vez, pueden romper conduciendo a la formación de productos volátiles (aldehídos, cetonas, alcoholes, furanonas, lactonas, etc.). Muchos de estos compuestos no sólo provocan **rancidez y sabores indeseables** en los lípidos, sino que también están implicados en la carcinogénesis, el envejecimiento y algunas enfermedades cardiovasculares. Se puede afirmar, por lo tanto, que la **oxidación lipídica** de los aceites comestibles y de los alimentos grasos es el principal motivo del deterioro de su calidad y, por lo tanto, juega un rol importante en la determinación de las condiciones de uso y, específicamente, de su tiempo de vida útil. [2, 3]

Es por eso que para los aceites y las grasas es importante conocer tanto su **estado oxidativo** en un momento determinado, como su **potencial relativo** para experimentar una degradación oxidativa. Sin embargo, todavía no existen métodos generales y completamente satisfactorios para la evaluación de estos parámetros. Habitualmente se recurre a la medida del contenido de peróxidos (**valor peróxido, PV**) como índice del **estado de oxidación**, pero esta medida sólo es válida si los peróxidos formados son lo suficientemente estables como para no descomponerse tras su formación. Por otra parte, existen varios enfoques para determinar la **estabilidad oxidativa**, algunos de los cuales consisten en evaluar el **período de inducción** observado antes de que comience la producción significativa de peróxidos. Este

período de inducción se puede determinar evaluando el tiempo necesario para alcanzar un determinado PV, o bien, monitorizando el consumo de oxígeno. El problema principal de todos estos métodos es que la estabilidad de los lípidos se determina a una temperatura fija, habitualmente muy por encima de la temperatura ambiente a la que se suelen almacenar los aceites y otros alimentos grasos. [3]

Se han establecido diferentes variables que influyen en la vida útil de los aceites, como son las **condiciones de procesado y almacenaje**, la **exposición a la luz**, el material de empaquetado, la disponibilidad de oxígeno o la adición de antioxidantes. El proceso de **autooxidación** es un proceso lento que requiere una cantidad de tiempo considerable para producir una cantidad suficiente de peróxidos y desarrollar sabores desagradables. Sin embargo, la **fotooxidación**, que implica el ataque directo del oxígeno singlete (generado por acción de la luz) a los ácidos grasos insaturados, es una reacción muy rápida. [3, 4]

El principal objetivo del trabajo realizado durante la estancia en la **Facultad de Química de la Universidad Politécnica de Gdańsk** ha sido la evaluación y cuantificación de los efectos de la luz en la degradación oxidativa del aceite de colza mediante la microextracción en fase sólida (SPME).

Así, en primer lugar, se ha desarrollado un método rápido y simple basado en la SPME acoplada con la Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS) que permitió la extracción, identificación y cuantificación de algunos de los productos de fotooxidación del aceite de colza, algunos de los cuales (aldehídos, principalmente) son indicadores de su rancidez. Finalmente se ha tratado de comparar y correlacionar los cambios observados en la composición del aceite (generación de aldehídos, ácidos carboxílicos...) durante su fotooxidación, con los resultados obtenidos en la aplicación de tests tradicionales que evalúan su calidad y estabilidad oxidativa (p.ej. método Rancimat).

Como resultado de este trabajo se ha publicado un artículo bajo el título "INVESTIGATION OF EDIBLE OILS OXIDATION STABILITY USING PHOTOOXIDATION AND SPME/GC METHOD FOR DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS—PRELIMINARY INVESTIGATION". Este artículo se adjunta a continuación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Koski, A.; Psomiadou, E.; Tsimidou, M.; Hopia, A.; Kefalas, P.; Wähälä, K.; Heinonen, M. Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 294-298.
- [2] Jelen, H.H.; Obuchowska, M.; Zawirska-Wojtasiak, R.; Wąsowicz, E. Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2360-2367.
- [3] Tian, K.; Dasgupta, P.K. Determination of oxidative stability of oils and fats. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1692-1698.
- [4] Anwar, F.; Shahid Chatha, S.A.; Hussain, A.I. Assessment of oxidative deterioration of soybean oil at ambient and sunlight storage. *Grasas y Aceites*, **2007**, 58, 390-395.

**INVESTIGATION OF EDIBLE OILS OXIDATION STABILITY
USING PHOTOOXIDATION AND SPME/GC METHOD FOR
DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS—PRELIMINARY
INVESTIGATION**

Justyna Gromadzka¹, Waldemar Wardencki¹, Marta Lores², Maria Llompart²,
Maria Fernandez-Alvarez², Katarzyna Lipińska¹

¹*Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdansk University of
Technology, Gdansk, Poland;*

²*Dpto. Química Analítica, Instituto de Investigación y Analisis Alimentarios,
Facultade de Química, Universidade de Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela, Spain*

Abstract

The resistance of edible oils to oxidative degradation, leading to rancidification, is an important parameter for assessing the quality of oil. This paper presents a new promising method to diagnose the volatile compounds which are products of oil oxidation reactions. Our experiment was carried out using a combined method of UV irradiation as an oxidation acceleration technique, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) as an extraction technique and capillary gas chromatography (GC) as an assay technique. Method precision and sensitivity expressed as RSD (<19%) and LOD (between 18 and 173 ng/mL) are satisfactory. The induction period set on hexanal/*t*-2-nonenal ratio (IP=6.67 h) is comparable with those obtained with the Rancimat method (4.64-6.73 h).

Keywords: UV irradiation, solid-phase microextraction (SPME), edible oils, oxidation products, volatile compounds

1. Introduction

In recent years rapeseed/canola oil has becoming increasingly popular again. The oil available nowadays comes from rapeseed, twice improved with lower glucosinolates and erucic acid content, and is referred to as double zero oil ("00"). It competes with olive oil, on account of its low price and nutritional advantages. Rapeseed oil is a rich source of fat-soluble vitamins A, D₃, E, K and essential polyunsaturated fatty acids, like linoleic acid (LA) and alpha-linolenic acid (LNA) with their good proportion equal to 2:1 [Pijanowski *et al.*, 2004; Drozdowski, 2002]. However, due to a high content of polyunsaturated fatty acids this oil impairs lipid changes in oxidation by atmospheric oxygen in the autooxidation process or during the lipoxygenase pathway [Cavalli *et al.*, 2004]. The rate of oxidation reaction increases with the degree of unsaturation or temperature increase (e.g. frying process). This reaction badly affects the natural aroma of the oil. In vegetable oils, like in other food ingredients, natural aroma is created by a characteristic composition of volatile compounds. In the creation of aroma bouquet both natural volatile compounds and derivative substances have a part, which came from extraction or pressing of oil and which are dissolved in oil [Gromadzka & Wardencki, 2007]. Short-chain hydrocarbons, ketones, aldehydes, alcohols, epoxides, esters and lactones may be formed, giving a smell and taste of rancidity [Drozdowski, 2002].

Among commonly used methods for determination of oil oxidation stability there are the Rancimat test and peroxide value determination. Peroxide value allows to determine only the total amount of oxidation products. It strongly depends on the analytical experience and measurement cannot be automated. In contrast, the Rancimat test is fully automated, but is usually performed at higher temperatures (100-120°C). Furthermore, the Rancimat test is an indirect method based on measurement of water conductivity in which volatile oil oxidation compounds are absorbed.

The promising method to diagnose the volatile compounds can be the solid-phase microextraction technique connected with gas chromatography coupled to mass spectrometry or flame ionization detector (SPME/GC/MS or SPME/GC/FID) [Gromadzka & Wardencki, 2007]. There are many different substances which can be indicators of the oxidation process but the level of hexanal in the sample or even the hexanal/nonanal ratio [Jiménez *et al.*, 2004] seem to be the most suitable. Hexanal is generated both in the

autooxidation process and during lipoxygenase pathway. In turn, nonanal is formed only in the autooxidation process of oleic acid and shows the highest rate of increase during the oxidation process and therefore may be the appropriate oxidation marker [Vichi *et al.*, 2003].

The aim of the present work was to develop a simple and reproducible method for the determination of the degree of rancidity of edible oil by analysing volatile compounds, using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and capillary gas chromatographic (GC) techniques. In comparison to the Rancimat test, the developing method should allow to identify and trace amounts of oxidation products of edible oils.

2. Materials and methods

2.1 Samples and reagents

Rapeseed oil used in this research was Kujawski Oil from Fat Factory Kruszwica S.A., purchased from a local supermarket. Solvents used in sample preparation: acetone (GC grade), methanol (gradient grade) and hexane (GC grade), were from Merck and standard reagents: hexanal, purity: >97% (GC) (Fluka), *t*-2-nonenal, purity: 97% (Aldrich), *t*-2-octenal, purity: tech. 94% (Aldrich), *t*-2-heptenal, purity: ~98% (GC) (Fluka), *t,t*-2,4-heptadienal, purity: >97% (GC) (Fluka), *t,t*-2,4-nonadienal, purity: 85% (Aldrich), and *t,t*-2,4-decadienal, purity: >85% (GC) (Fluka).

2.2 Photoreaction conditions

A photoreactor (homemade at the University of Santiago de Compostela, Spain) with two ultraviolet low-pressure mercury lamps (10 W and 8 W) with maximum emission at 254 nm was used in this research. The photoreactor has three possible modes of work (8 W, 10 W, 18 W). In this case all experiments were carried out with a power of 18 W, so both the lamps were turned on. A sample containing 6 mL of oil was poured to two quartz closed cells (3 mL in each). Later the cells were placed into the photoreactor for ultraviolet irradiation at different irradiation times (15 min – 12 h).

2.3 Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) conditions

Oil samples in volume of 4 mL were placed in 10 mL vials and closed by an aluminium cap with a PTFE-faced septum. Before extraction, stabilization of the headspace in the vial was conducted by equilibration for 3 min at 40°C. On the basis of literature studies a combined SPME fiber, coated with divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/ PDMS, 2 cm long, with 50/30 µm coating thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA) stationary phase, was chosen as most appropriate for the extraction of volatile compounds from the oil matrix. The extraction was carried out by inserting the fiber into the headspace of the oil sample for 30 min at 40 °C with a magnetic stirring. After exposure, the fiber was thermally desorbed for 5 min into the GC injector at 250°C.

2.4 Gas chromatography conditions

Analyses were carried out on a CP-3800 (Varian, Palo Alto, CA, USA) gas chromatograph equipped with Varian Saturn 2000 Ion Trap Mass Spectrometer and Flame Ionization Detector. The injection was made for 2 min using the splitless mode. The temperature of the injector was 250 °C and that of detector 240 °C. The separation was carried out on two columns with different polarity: on a HP-5MS column with a stationary phase of 5% poly(diphenyl) and 95% poly(dimethylsiloxane) (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Hewlett-Packard) and on a DB-WAX column with 20% poly(diphenyl) and 80% poly(dimethylsiloxane) (30 m x 0.25 mm x 0.5 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) with an oven temperature program as follows: initial temperature was 32 °C held for 3 min, then ramped at 5 °C/min to 80 °C, again ramped at 10 °C/min to 200 °C and then once again ramped at 10 °C/min to a final temperature of 280 °C. The total time of analysis was 29 min. The carrier gas was helium with a flow rate of 1.2 mL/min.

To identify oil oxidation volatiles a Varian Saturn 2000 Ion Trap Mass Spectrometer was used. The detector operated in electron impact mode (70 eV) at 250 °C. The temperatures of the ion source and of the transfer line were 250 °C and 300 °C, respectively, and the carrier gas flow rate was 1 mL/min. Detection was carried out in the scan mode between 25 and 300 amu. Detected components were tentatively identified by matching EI⁺ spectra against the NIST Mass Spectral Database containing

about 100 thousand compounds and by comparing their retention times with those of standards.

3. Results and discussion

At the first stage of the experiment detection possibilities of the method were investigated. In order to calculate the repeatability and limits of detection and quantification (RSD, LODs and LOQs, respectively), three HS-SPME experiments were carried out using as a sample of oil (4 mL) spiked with a mixture of selected aldehyde standards. The obtained values of RSD, LOD and LOQ are shown in Table 1.

Table 1. RSD, LODs, LOQs for HS-SPME extraction in oil sample with spike standards (n=3).

<i>Compound</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>LOD (ng/mL)</i>	<i>LOQ (ng/mL)</i>
hexanal	6.6	25	82
<i>t</i> -2-heptenal	10.8	21	70
<i>t,t</i> -2,4-heptadienal	19.0	18	61
<i>t</i> -2-octenal	11.1	22	72
<i>t</i> -2-nonenal	13.9	47	158
<i>t,t</i> -2,4-nonadienal	11.9	129	429
<i>t,t</i> -2,4-decadienal	18.5	173	577

The method's precision expressed as the relative standard deviation (RSD) ranged from 6.6 to 19%. Data in Table 1 shows that repeatability achieved was satisfactory. The average error in SPME has been described by RSD=2.5-37% [Keszler & Heberger, 1998]. The precision of the proposed method seems to be better than the average observed for most headspace analyses. The LODs and LOQs (Table 1) were calculated on the basis of the signal to noise ratio obtained for the studied aldehydes in SPME experiments. The obtained detection limits (18-173 ng/mL) are generally acceptable for headspace analyses [Keszler & Heberger, 1998].

In this research UV irradiation was used to accelerate the oxidation process in real edible oil samples [Szukalska, 2003; Hęś *et al.*, 2001]. Photodegradation experiments of rapeseed oil with different irradiation times (Figure 1) were carried out in order to assess the photoformation-photodegradation kinetics of volatile oil oxidation products.

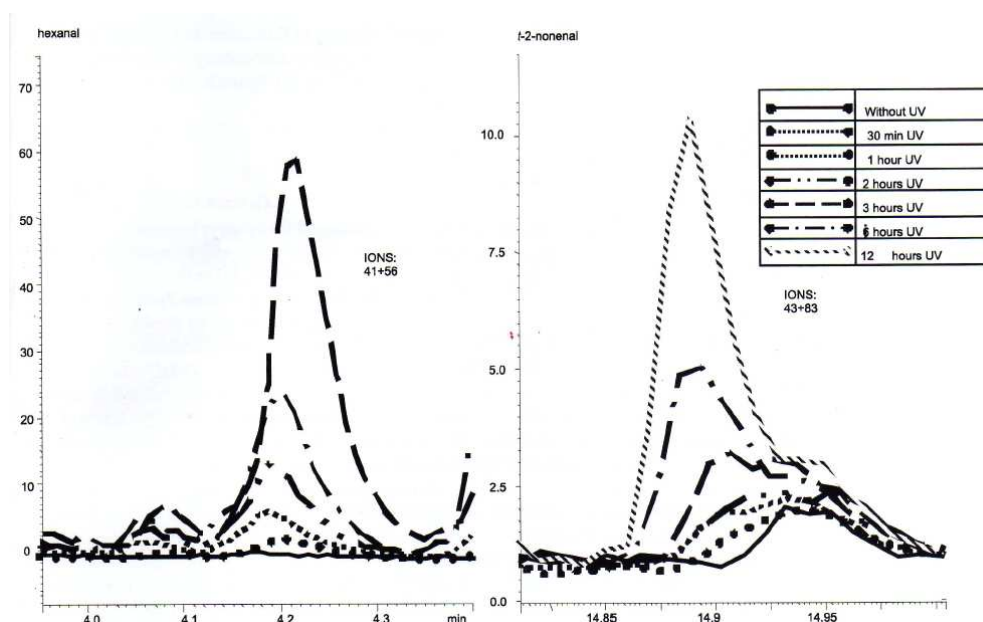


Figure 1. Chromatograms of hexanal and t-2-nonenal at different irradiation times.

In general, the concentration of detected compounds increases during the photoinduced process (Figure 2). Similar behaviour was observed during the investigation of the influence of temperature on oil volatiles [Jeleń *et al.*, 2000, 2007; Mildner-Szkudlarz *et al.*, 2003].

Some identified oil oxidation volatiles with the highest probability factor are listed in Table 2. Most of these compounds were also mentioned by other authors who investigated oil degradation processes [Jeleń *et al.*, 2000, 2007; Keszler & Herberger, 1998; Mildner-Szkudlarz *et al.*, 2003].

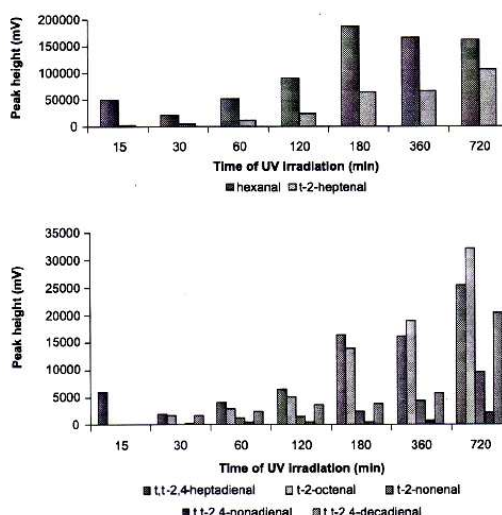


Figure 2. The increase of rapeseed oil oxidation products during UV irradiation time.

Table 2. Retention times of selected volatile products identified with high probability (HP-5MS column).

<i>Compound</i>	<i>Retention time, t_r (min)</i>
1-pentanol	3.76
hexanal	4.27
2-hexenal	5.98
2-heptanone	7.14
<i>t</i> -2-heptenal	9.00
1-octen-3-ol	9.99
6-methyl-5-hepten-2-one	10.18
2-pentylfuran	10.27
hexanoic acid	10.55
octanal	10.66
<i>t,t</i> -2,4-heptadienal	10.77
<i>t</i> -2-octenal	12.17
<i>t</i> -2-nonenal	14.77
2-decanone	15.55
<i>t,t</i> -2,4-nonadienal	15.80
2-decenal	16.75
2-undecanone	17.26
<i>t,t</i> -2,4-decadienal	17.50
2-undecenal	18.29

The best indicator of this process, as it was mentioned before, can be the hexanal/nonanal ratio. In our experiments, instead of nonanal, *t*-2-nonenal (its derivative) was used.

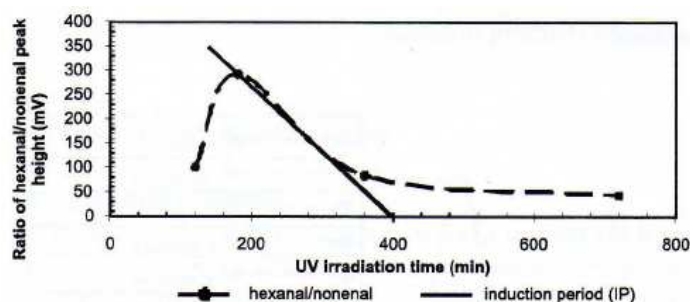


Figure 3. Dependence of hexanal on *t*-2-nonenal ratio in the UV irradiation process.

The induction period (IP), a period in which the testing oil remains oxidatively stable, was set graphically (Figure 3) on the basis of the hexanal/*t*-2-nonenal peak height ratio and its value is about 400 min, *i.e.* 6.67 h. This value

corresponds to the IP determined by Maszewska & Krygier who used the Rancimat method [Platek, 1995]. They applied the following conditions: mass of oil sample – 2.5 g,

temperature – 120 °C, air flow – 20 dm³/h, and water volume in conductivity cell – 60 mL. They obtained the IP for rapeseed oil at a level of 4.64-6.73 h [Maszewska & Krygier, 2005]. According to Platek [1995], who used the same conditions as mentioned above, average induction time for rapeseed oil at 120 °C is 4.9 h. In our research, the investigated oil reached better stability – its induction period was nearly 2 h longer than that obtained by Platek [1995].

4. Conclusions

The postulated method enables estimating the stage of oxidation of the analysed sample both qualitatively and quantitatively. Moreover, this method is very sensitive and affords the possibility of tracing the oxidation process, even during initial stage. It enables detecting classical oil oxidation products with satisfactory precision and repeatability expressed as the relative standard deviation (RSD) below 19% and with detection limits between 18-173 ng/mL, the values are generally acceptable for headspace analysis. This procedure can be applied for the classification and organoleptic quality assessment of vegetable oils of different quality or produced from various raw materials. It also allows the determination of the induction period using the hexanal/nonanal ratio, which corresponds to the Rancimat method. Furthermore the use of this method allows to detect adulteration of good quality oils by cheaper ones.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No. 312 056 31) and by FEDER funding project CTQ2006-03334/BQU of the Spanish Ministry of Education and Science. Maria Fernandez-Alvarez gratefully acknowledges the award of a doctoral grant (FPU) from the Spanish Ministry of Education and Science.

References

[1] Cavalli J.-F, Fernandez X., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A.-M., Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. Food Chem., 2004, 88, 151-157.

- [2] Drozdowski B., Lipidy. 2002, in: *Chemia Żywności* (ed. Sikorski Z.E.), WNT, Warszawa, pp. 171-227 (in Polish).
- [3] Gromadzka J., Wardencki W., New instrumental methods to assess edible oils quality. *Tł. Jad.*, 2007, 42(1/2), 73-92.
- [4] Heś M, Korczak J., Nogala-Kałużka M, Jędrusek-Golińska A., Gramaza A., Accelerated methods in durability research of stabilized rapeseed oil. *Rośliny Oleiste*, 2001, 22, 517-526 (in Polish).
- [5] Jeleń H.H., Obuchowska M., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E., Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 2360-2367.
- [6] Jeleń H.H., Mildner-Szkudlarz S., Jasińska I., Wąsowicz E., A headspace – SPME – MS method for monitoring rapeseed oil autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2007, 84, 509-517.
- [7] Jimenez A., Beltran G., Aguilera M.P., Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1028, 321-324.
- [8] Keszler A., Herberger K., Identification of volatile compounds in sunflower oil by headspace SPME and ion-trap GC/MS. *J. High Resol. Chromatogr.*, 1998, 21, 368-370.
- [9] Maszewska M., Krygier K., Research on relationship between occurrence of peroxides and derivative – volatile oxidative products in refined rapeseed and sunflower oils. *Rosliny Oleiste*, 2005, 26, 611-620, (in Polish).
- [10] Mildner-Szkudlarz S., Jeleń H.H., Zawirska-Wojtasiak R., Wąsowicz E., Application of headspace-solid phase microextraction and multivariate analysis for plant oils differentiation. *Food Chem.*, 2003, 83, 515-522.
- [11] Pijanowski E., Dłużewski ML, Dłużewska A., Jarczyk A., *Ogólna technologia żywności*, 2004, WNT, Warszawa (in Polish).
- [12] Płatek T., Determination of oils and fats oxidation stability using Rancimat apparatus. *Tł. Jad.*, 1995, 30, 25-34 (in Polish).
- [13] Szukalska E., Some problems of fats oxidation. *Tł. Jad.*, 2003, 38, 42-58 (in Polish).
- [14] Vichi S., Pizzale L., Conté L.S., Buxaderas S., Pez-Tamames E.L., Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: characterization of virgin olive oils from two distinct geographical areas of Northern Italy. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 6572-6577.

ANEXO II

ANEXO II. LISTADO DE PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral han sido publicados o están pendientes de publicación en revistas científicas los siguientes trabajos:

- Fernández-Álvarez, M.; Sánchez-Prado, L.; Lores, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Alternative sample preparation method for photochemical studies: synthetic pyrethroid photochemistry. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1152, 156-167.
- Fernández-Álvarez, M.; Lores, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Cela, R. The photochemical behaviour of five household pyrethroid insecticides and a synergist as studied by photo-solid-phase microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 1235-1247.
- Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Lores, M.; Fernández-Álvarez, M.; García-Jares, C.; Cela, R. Further research on the photo-SPME of triclosan. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 1548-1557.
- Fernández-Álvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, J.P.; Lores, M.; García-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 617, 37-50.
- Fernández-Álvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, J.P.; Lores, M.; García-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1188, 154-163.
- Gromadzka, J.; Wardencki, W.; Lores, M.; Llompart, M.; Fernández-Álvarez, M.; Lipińska, K. Investigation of edible oils oxidation stability using photooxidation and SPME/GC method for determination of volatile compounds. Preliminary investigation. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2008**, 58, 321-324.

- Fernández-Álvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, J.P.; Lores, M.; García-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous determination of pyrethroid and organochlorinated pesticides in cattle feed. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 2832-2842.
- Fernández-Álvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, J.P.; Lores, M.; García-Jares, C.; García-Chao, M.; Dagnac, T. Simultaneous extraction and clean-up method based on pressurized solvent extraction for multiresidue analysis of pesticides in complex feed samples. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 3963-3973.
- Sánchez-Prado, L.; Llompart, M.; Fernández-Álvarez, M.; García-Jares, C.; Lores, M. A novel use of sorbents for photochemical studies: photo-solid-phase microextraction (photo-SPME). En *Sorbents: Properties, Materials and Applications*, Series: Environmental Research Advances. Willis, T.P. Ed.; NOVA Publishers, USA, **2009**. (in press, ISBN: 978-1-60741-851-1)
- Fernández-Álvarez, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Dagnac, T.; Lores, M. Investigation of the photochemical behaviour of lacking-cyclopropane-ring pyrethroids by photo-solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Submitted to *Rapid Commun. Mass Sp.*
- Fernández-Álvarez, M.; Lores, M.; Jover, E.; García-Jares, C.; Bayona, J.M.; Llompart, M. Photo-solid phase microextraction of selected indoor air pollutants from office buildings. Identification of their photolysis intermediates. Submitted to *J. Chromatogr. A*.
- Domínguez, C.; Fernández-Álvarez, M.; Baltasar, L.; Jover, E.; Llompart, M.; Codina, J.; Bayona, J.M. (in preparation) Screening of volatile and semivolatile organic contaminants in indoor air collected in 63 Spanish offices. To be submitted to *Indoor Air*.
- Fernández-Álvarez, M.; Llompart, M.; García-Jares, C.; Dagnac, T.; Lores, M. (in preparation) Pyrethroids photochemistry. To be submitted to *Chemosphere*.

ANEXO III

ANEXO III. ACRÓNIMOS

• ADI	A dmissible D aily I ntake	Consumo diario admisible
• AOP	A dvanced O xidation P rocess	Proceso de oxidación avanzado
• ASE	A ccelerated S olvent E xtraction	Extracción acelerada por disolventes
• BHT	B utylated H ydroxy T oluene	Hidroxitolueno butilado
• CACF	C old A ctivated F iber	---
• CAR	C arboxen	Carboxen
• CAS	C hemical A bstracts S ervice	---
• CI	C hemical I onization	Ionización química
• CW	C arbowax	Carbowax
• DAD	D iode A rray D etector	Detector de red de diodos
• DDD	D ichlorodiphenyldichloro ethane	Diclorodifenildicloroetano
• DIPN	D iisopropylnaphthalene	Diisopropilnaftaleno
• DDE	1,1-Dichloro-2,2-di(chlorophenyl)ethylene	1,1-Dicloro-2,2-di(clorofenil)etileno
• DDT	D ichlorodiphenyltrichloro ethane	Diclorodifeniltricloro etano
• dSPE	d ispersive S olid- P hase E xtraction	Extracción en fase sólida dispersiva
• DSPME	D irect S olid P hase M icro e xtraction	Microextracción en fase sólida por inmersión
• DVB	D ivinyl b enzene	Divinilbenceno
• ECD	E lectron C apture D etector	Detector de captura electrónica
• ECPA	E uropean C rop P rotection A ssociation	Asociación para la protección del cultivo en Europa
• EI	E lectronic I mpact	Impacto electrónico
• EPA	E nvironmental P rotection A gency	Agencia de protección medioambiental
• ESI	E lectro S pray I onization	Ionización por electrospray
• EU	E uropean U nion	Unión Europea
• FAO	F ood and A gricultural O rganization of the United Nations	---

• FBE	F luidized- B ed E xtraction	Extracción en lecho fluidizado
• FID	F lame I onization D etector	Detector de ionización de llama
• FT	F ourier T ransform	Transformada de Fourier
• GC	G as C hromatography	Cromatografía de gases
• GLC	G as- L iquid C hromatography	Cromatografía Gas-Líquido
• GPC	G el P ermeation C hromatography	Cromatografía de permeación en gel
• HCB	H exachlorobenzene	Hexaclorobenceno
• HPLC	H igh P erformance L iquid C hromatography	Cromatografía líquida de alta resolución
• HSSPME	H eadspace- S olid P hase M icro e xtraction	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza
• IAQ	I ndoor A ir Q uality	Calidad del aire de interior
• IARC	I nternational A gency for R esearch on C ancer	Agencia internacional para la investigación del cáncer
• IP	I nduction P eriod	Período de inducción
• IR	I nfra R ed	Infrarrojo
• IUPAC	I nternational U nion of P ure and A ppled C hemistry	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
• JMPR	J oint F AO/ W HO M eeting on P esticide R esidue	Reunión conjunta FAO/OMS sobre residuos de Pesticidas
• K_{ow}	Partition Constant O ctanol- W ater	Coeficiente de partición octanol/agua
• LA	L inoleic A cid	Ácido linoleico
• LC	L iquid C hromatography	Cromatografía líquida
• LC₅₀	L ethal C oncentration (50 %)	Concentración letal para el 50% de la población expuesta
• LD₅₀	L ethal D ose (50 %)	Dosis letal para el 50% de la población expuesta
• LIGAL	---	L aboratorio I nterprofesional G alego de A nálise do L eite
• LLE	L iquid- L iquid E xtraction	Extracción líquido-líquido
• LNA	L inolenic a cid	Ácido linolénico
• LOD	L imit O f D etection	Límite de detección

• LOQ	Limit Of Quantification	Límite de cuantificación
• LS	---	Lipoatrofia S emicircular
• MAE	Microwave Assisted Extraction	Extracción asistida por microondas
• MAME	Microwave Assisted Micellar Extraction	Extracción micelar asistida por microondas
• MIPs	Molecularly Imprinted Polymers	Polímeros de impresión molecular
• MO	---	M ateria O rgánica
• MRL	Maximum Residue Level	Nivel de residuo máximo
• MS	---	M ateria S eca
• MS	Mass Spectrometry	Espectrometría de masas
• MSPD	Matrix Solid-Phase Dispersion	Dispersión de matriz en fase sólida
• MWCNT	Multiwalled Carbon Nanotubes	---
• NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Resonancia magnética nuclear
• PA	Polyacrylate	Poliacrilato
• PBB	Polybrominated Biphenyl	Bifenilo polibromado
• PBDE	Polybrominated Diphenyl Ether	Éter de difenilo polibromado
• PBO	Piperonyl Butoxide	Butóxido de piperonilo
• PCB	Polychlorinated Biphenyl	Bifenilo policlorado
• PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetilsiloxano
• PFE	Pressurized Fluid Extraction	Extracción con fluidos presurizados
• PLE	Pressurized Liquid Extraction	Extracción con líquidos presurizados
• POP	Persistent Organic Pollutant	Contaminante orgánico persistente
• PSA	Primary and Secondary Amine	Amina primaria y secundaria
• PSE	Pressurized Solvent Extraction	Extracción con disolventes presurizados
• PTFE	Politetrafluoroethylene	Politetrafluoroetileno
• PV	Peroxide Value	Valor peróxido
• PVDF	Polyvinylidene Difluoride	Difluoruro de polivinilideno
• OMS	---	O rganización M undial de la S alud

• QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	---
• RSD	Relative Standard Deviation	Desviación estándar relative
• RTC	Resource Technology Corporation	---
• SBSE	Stir-Bar Sorptive Extraction	Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras
• SFE	Supercritical Fluid Extraction	Extracción con fluidos supercríticos
• SPE	Solid Phase Extraction	Extracción en fase sólida
• SPME	Solid Phase Microextraction	Microextracción en fase sólida
• TLC	Thin Layer Chromatography	Cromatografía en capa fina
• USE	UltraSonic Extraction	Extracción por ultrasonidos
• UV	UltraViolet	Ultravioleta
• WHO	World Health Organization	---

